

Dt. 41

RIJKSFACULTEIT DER LANDBOUWWETENSCHAPPEN – GENT

LEERSTOEL VOOR VOEDINGSLEER EN HYGIËNE

Bijdrage tot de studie van de extraheerbare
stikstofverbindingen in doornhaai (*Squalus acanthias* L.)
en de evolutie ervan tijdens het bewaren in ijs

door

Ir. Wilfried VYNCKE

Proefschrift tot het bekomen van de graad van
Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen

op gezag van

Rector Prof. Dr. Ir. A.G. BAPTIST

Hoogleraar in de Landhuishoudkunde

Promotor : Prof. Dr. Ir. H. HENDERICKX

1969

Gent - Rijkfaculteit
Landbouwwetenschappen
Bibliotheek



Bijstellingen

1. Tegen de door Wittfogel (Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch., 134, 1, 1967) voorgestelde methode om te bepalen of vis vóór of na de rigor mortis werd diepgevroren, zijn ernstige bezwaren in te brengen.
2. De vorming van dimethylamine tijdens het bederf van vis is uitsluitend te wijten aan endogene enzymen.
3. De methode van Tarladgis (J. Sci. Food Agric., 15, 602, 1964) voor de bepaling van het TBA-getal als maatstaf voor de oxydatieve vetranzigheid, kan niet rechtstreeks op visserijprodukten worden toegepast.

VOORWOORD

=====

Bij het voorleggen van dit proefschrift neem ik gaarne de gelegenheid te baat om mijn promotor, Prof. Dr. Ir. H. Henderickx mijn diepe erkentelijkheid te betuigen voor de hulp en de steun verleend bij de verwezenlijking van dit werk.

Ik dank zeer oprecht Prof. Dr. J. Martin, titularis van de leerstoel voor voedingsleer en hygiëne, voor zijn nooit aflatende belangstelling en stimulerende invloed.

Mijn dank gaat ook naar de Professoren Dr. Ir. A. Cottenie, Ir. E. Maes en Dr. N. Schamp die het manuscript hebben nagezien.

Aan Ir. F. Lievens, Directeur-Generaal van het Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek bij het Ministerie van Landbouw, Ir. A. Vanslijcken, Directeur van het Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek te Gent en Dr. P. Hovart, Directeur van het Rijksstation voor Zeevisserij te Oostende wens ik mijn dank te betuigen voor de gelegenheid die mij geboden werd dit proefschrift in het kader van de programma's voor wetenschappelijk zeevisserij-onderzoek te verwezenlijken.

Zeer hartelijk dank ik de heren I. Dobbelaere en L. Sanders voor de gewetensvolle en kundige uitvoering van een groot deel van het experimenteel werk.

Een speciaal dankwoord ook voor de heren R. Aspeslagh en R. Vandenberghe die de nodige speciale apparatuur hebben vervaardigd, voor de bemanningsleden van het onderzoekingsvaartuig "Hinders" en van de vissersschepen die de proefvis hebben aangevoerd, en voor mevr. C. Willems, mej. D. Vermeesch en de heren R. Focke en P. Vandromme die tekst en tekeningen afwerkten.

Gent, 6 juni 1969.

=====

	<u>Blz.</u>
Inleiding en probleemstelling	1
Hoofdstuk 1 - Literatuurstudie	4
1.1. Algemene gegevens	4
1.2. Het bederf van S. acanthias	6
1.2.1. De aan bederf onderhevige substraten	6
1.2.2. De extraheerbare stikstofbestanddelen	6
1.2.2.1. Ureum	7
1.2.2.2. TMAO en verwante verbindingen	8
1.2.2.3. Creatine en creatinine	10
1.2.2.4. Vrije aminozuren en verwante ver- bindingen	11
1.2.3. Veranderingen in de extraheerbare stikstof- fraktie post-mortem	14
1.2.3.1. Autolyse	14
1.2.3.2. Bakterieel bederf	16
1.2.3.3. Tijdens het bederf gevormde afbraak- produkten	18
Hoofdstuk 2 - Methoden en materialen	23
2.1. Proefvis	23
2.2. Analytische methoden	24
2.2.1. Ammoniak	26
2.2.2. Ureum	30
2.2.3. Trimethylamine	32
2.2.4. Trimethylamineoxyde	36
2.2.5. Methylamine	39
2.2.6. Dimethylamine	39

2.2.7. Creatinine	39
2.2.8. Creatine	41
2.2.9. α -aminostikstof	42
2.2.10. Peptiden	45
2.2.11. Vrije aminozuren	46
2.2.12. Cysteïne en cystine	53
2.2.13. Proline	55
2.2.14. Hydroxyproline	56
2.2.15. Vrij choline	58
2.2.16. Betaïne	60
2.2.17. Waterstofsulfide	62
2.2.18. Indol	62
2.2.19. Vluchtige reducerende stoffen	62
2.2.20. Totale stikstofgehalte	65
2.2.21. Droge stofgehalte	66
2.2.22. Kathepsinenaktiviteit	66
2.2.23. Aktiviteit van de neutrale endopeptidasen	67
2.2.24. Elektrische weerstand	67
2.2.25. pH-metingen	68
2.2.26. Redoxmetingen	68
2.3. Organoleptische keuring	68
Hoofdstuk 3 - Invloed van biologische factoren	71
3.1. Modus operandi	71
3.2. Resultaten en diskussie	75
3.2.1. Maaginhoud (voeding)	75
3.2.2. Individuele bepalingen	79
3.2.2.1. Ureum en ammoniak	81
3.2.2.2. Trimethylamineoxyde	81
3.2.2.3. Creatine en creatinine	82
3.2.2.4. α -aminostikstof	82

3.2.2.5. Peptiden	84
3.2.2.6. Vrije aminozuren	86
3.2.2.7. Cysteïne en cystine	89
3.2.2.8. Proline en hydroxyproline	90
3.2.2.9. Vrij choline en betaïne	90
3.2.2.10. Droge stof- en totaal stikstofgehalte	91
3.2.2.11. Proteolytische aktiviteit	92
3.3. Besluiten	92
Hoofdstuk 4 - Evolutie van de extraheerbare stikstofver- bindingen tijdens het bewaren van <i>S. acanthias</i>	94
4.1. Modus operandi	94
4.2. Resultaten en diskussie	96
4.2.1. Uitloogproeven	96
4.2.2. Individuele bepalingen	100
4.2.2.1. Ammoniak	100
4.2.2.2. Ureum	102
4.2.2.3. Trimethylamine	102
4.2.2.4. Trimethylamineoxyde	105
4.2.2.5. Creatine en creatinine	105
4.2.2.6. α -amino- en peptidenstikstof	106
4.2.2.7. Vrije aminozuren	108
4.2.2.8. Cysteïne en cystine	112
4.2.2.9. Proline en hydroxyproline	116
4.2.2.10. Vrij choline en betaïne	117
4.2.2.11. Methylamine	118
4.2.2.12. Dimethylamine	118
4.2.2.13. Vluchtige reducerende stoffen	118
4.2.2.14. pH	119
4.2.2.15. Elektrische weerstand	120
4.2.2.16. Proteolytische aktiviteit	121
4.2.2.17. Organoleptische keuring	123

4.2.3. Aanvullende proeven met geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe doornhaaien	124
4.3. Besluiten	126
Hoofdstuk 5 - De objektieve kwaliteitsbepaling van doornhaai	128
Samenvatting en besluiten	134
Literatuur	141

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING.

=====

De jongste tien jaar is de wereldproduktie van zeevis praktisch verdubbeld, nl. van 31 tot 61 miljoen ton (FAO 1968). Alles laat daarenboven voorzien dat de ontwikkeling van de visserij in de komende jaren nog aanzienlijker zal zijn en dat de vis een steeds belangrijkere plaats onder de voedingswaren van dierlijke oorsprong zal innemen.

Daar de vis echter één van de meest bederfelijke produkten is, stelt het behoud van de kwaliteit zware problemen. Vooraleer doeltreffende methoden voor het verlengen van de versheid te kunnen ontwikkelen, is een grondige kennis van de bederfverschijnselen noodzakelijk.

Werd op dit gebied reeds heel wat wetenschappelijk onderzoek op de beenvissen en voornamelijk op de grote industriële soorten zoals kabeljauw, haring, zalm, tonijn enz. verricht dan werd tot nog toe zeer weinig aandacht aan de kraakbeenvissen (roggen, haaien) besteed.

Voor dit proefschrift werd de doornhaai (*Squalus acanthias* L) gekozen. De aanvoer van deze vis is sedert de tweede wereldoorlog in Europa immers aanzienlijk toegenomen, nl. van 20.000 tot 60.000 ton in recente jaren. In België wordt hiervan per jaar ongeveer 900.000 kg in de vissershavens binnengebracht ; men kan hierbij opmerken dat praktisch alle doornhaaien ontkopt en gestroopt onder de benaming "zeepaling" in de handel gebracht worden.

Over de biochemische veranderingen tijdens het bederf van doornhaai is zeer weinig bekend. Deze thesis bleef evenwel beperkt tot de extraheerbare stikstofverbindingen (niet eiwitbestanddelen) die voor de biochemische kwaliteitsstudie belangrijke componenten zijn.

In de eerste plaats kunnen zij in de grondstof (pas gevangen vis) door kwalitatieve en kwantitatieve verschillen het verder verloop van het bederf beïnvloeden. Het is immers een feit dat biologische factoren zoals levensmilieu, geslachtscyclus, seizoen, voeding, ouderdom, enz. de samenstelling van de vis in het algemeen en deze van de extraheerbare stikstofverbindingen in het bijzonder, kunnen wijzigen en aldus de evolutie van de diverse afbraakprocessen na de dood van de vis kunnen beïnvloeden (Bramstedt 1962).

Een tweede reden is dat deze verbindingen tijdens de daarop volgende bewaarperiode in aanzienlijke mate worden gevormd, zodat hun studie veel informatie over de bederfverschijnselen kan bijbrengen.

Daar hierover voor *S. acanthias* weinig of niets bekend is, is het doel van dit proefschrift :

1. Na te gaan hoe de belangrijkste biologische factoren, nl. geslacht, geslachtsrijpheid (ouderdom) seizoen en voeding het gehalte aan de voornaamste extraheerbare stikstofverbindingen in pas gevangen doornhaai beïnvloeden en welke variantie hierbij voorkomt.
2. Tijdens bewaarproeven in ijs te bestuderen hoe de eventuele verschillen in samenstelling van de grondstof door bovenvermelde factoren veroorzaakt, de evolutie van de extraheerbare stikstofbestanddelen en de snelheid van bederf van de vis kunnen beïnvloeden.
3. Te onderzoeken welke verbindingen als geschikte versheidsindikatoren voor de objektieve kwaliteitsbepaling van doornhaai kunnen worden gebruikt.

Het onderzoek bleef beperkt tot de periode beginnende na de rigor mortis en eindigende met de eerste duidelijke tekens van bederf, m.a.w. de periode die voor de commerciële praktijk van belang

is. De purine-derivaten (nucleïnezuren, nucleotiden, enz.) werden niet in deze dissertatie behandeld. Zij zijn trouwens vooral van betekenis in de periode gaande van de dood van de vis tot de rigor mortis (Soudan 1965).

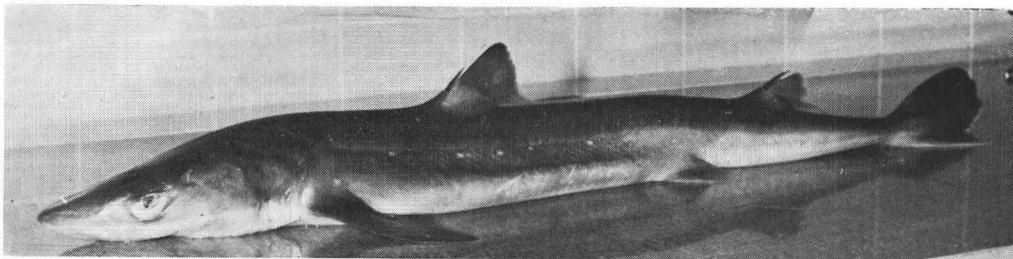


Fig. 1 — De doornhaai (*Squalus acanthias* L.)

populatie bewoont het zeegebied tussen Schotland en Noorwegen in de winter maar is vooral gekoncentreerd rond de Shetlands en de Orkaden gedurende de zomer.

De Kanaal-populatie bevindt zich in de winter hoofdzakelijk in het Kanaal en migreert grotendeels in de lente naar het zuidelijk deel van de Noordzee.

S. acanthias is ovovivipaar. De voortplantingscyclus is uitzonderlijk lang en duurt van het begin van de ontwikkeling van de eieren tot de geboorte van de jongen ongeveer 48 maanden. Daar twee cyclussen gelijktijdig verlopen kan de doornhaai om de twee jaar jongen afwerpen.

De eerste cyclus geschiedt in de eierstok. Na 24 maanden zijn de eieren volledig ontwikkeld en treden in de twee baarmoeders waar ze bevrucht worden (2de cyclus). Na 36 maanden breekt het eikapsel en de embryo's komen vrij in de uteri te liggen. Na 48 maanden tenslotte worden de jongen geboren en hebben dan een gemiddelde lengte van 27,5 cm. Hun aantal schommelt tussen 3 en 15 (gemiddeld 7).

De ovulatie gebeurt gewoonlijk in december-januari en de geboorte in november tot januari (Holden en Meadows 1962).

De geslachtsrijpheid wordt bij de mannetjes bij een kleinere lengte dan bij de wijfjes bereikt.

Tenslotte kan worden vermeld dat de osmoregulatie van de doornhaai en andere kraakbeenvissen essentieel van deze van de beenvissen verschilt, waar de inwendige osmotische druk kleiner dan de uitwendige is (hypotonie). Men heeft integendeel een lichte hypertonie, die behouden blijft door de aanwezigheid van hoge concentraties aan ureum en trimethylamineoxyde (Forster 1967).

1.2. Het bederf van S. Acanthias.

1.2.1. De aan bederf onderhevige substraten.

Om de evolutie van de extraheerbare stikstofbestanddelen tijdens het bederf te kunnen volgen, is een grondig inzicht in de samenstelling van de doornhaai, m.a.w. van de aan bederf onderhevige substraten noodzakelijk.

Over de algemene samenstelling van *S. acanthias* komen in de literatuur slechts gegevens van Reay et al. (1943) en van Shewan (1951) voor, die dan nog op een zeer beperkt aantal individuen werden bepaald. Volgens deze auteurs bestaat de doornhaai uit :

Water : 75-78 %

Totale stikstof : 3,3-4,0 %

Niet-eiwitgebonden stikstof : 1,0-1,3 %

Lipiden : 3,9-5,6 %

Koolhydraten : < 0,1 %

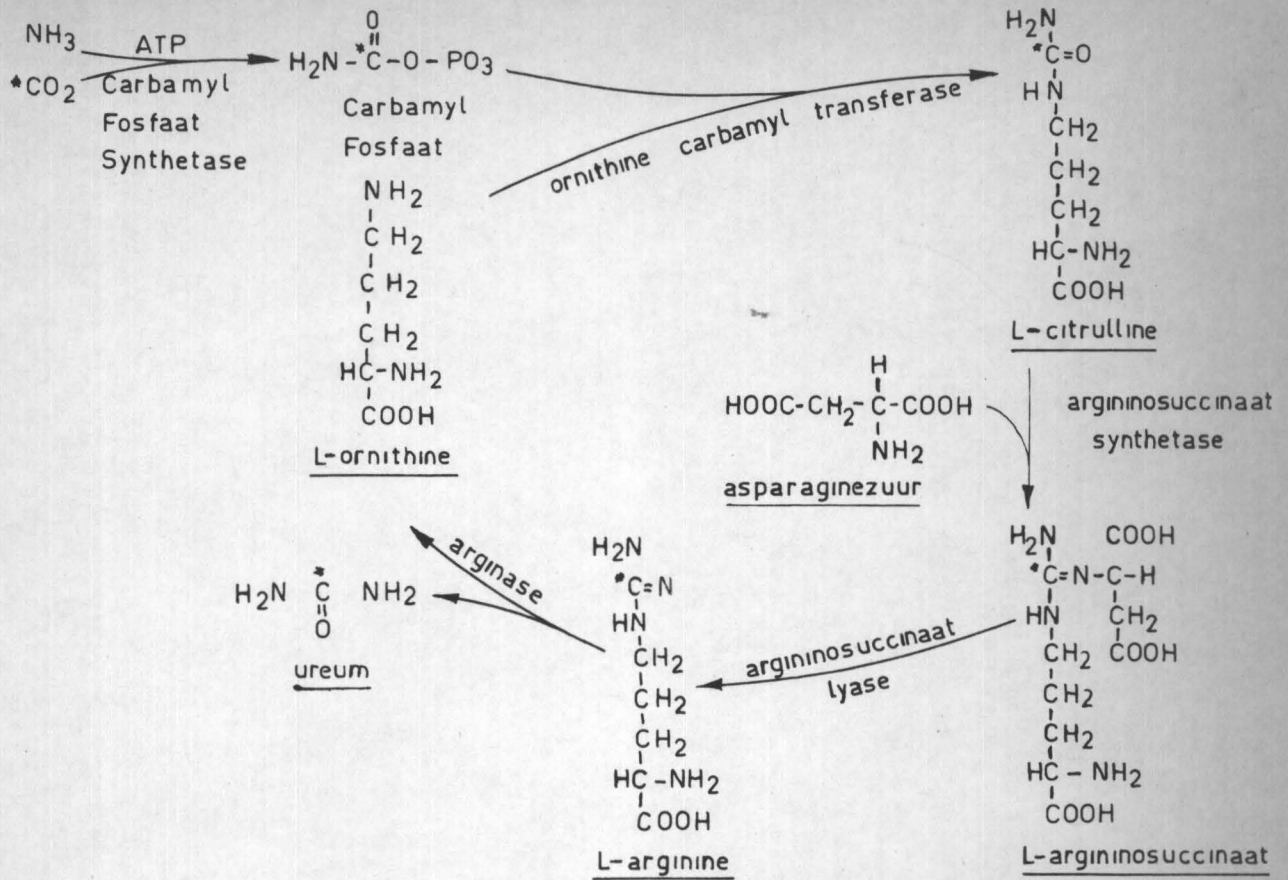
De afbraak van de lipiden en de koolhydraten wordt in dit proefschrift niet verder behandeld.

1.2.2. De extraheerbare stikstofbestanddelen.

Bij de doornhaai -- zoals bij de andere dwarsbekken -- draagt de niet-eiwit-fractie zowat 34 % van de totale stikstof, t.o.v. 9,2 à 18,3 % bij de beenvissen (Shewan 1951).

Deze fractie bestaat overwegend uit (a) ureum ; (b) trimethylamineoxyde (TMAO) en verwante kwaternaire ammoniumverbindingen (bv. betaïne, choline) ; (c) guanidine derivaten (bv. creatine, creatinine) ; (d) vrije aminozuren en verwante verbindingen ; (e) peptiden ;

① ORNITHINE CYCLUS



② PURINE WEG

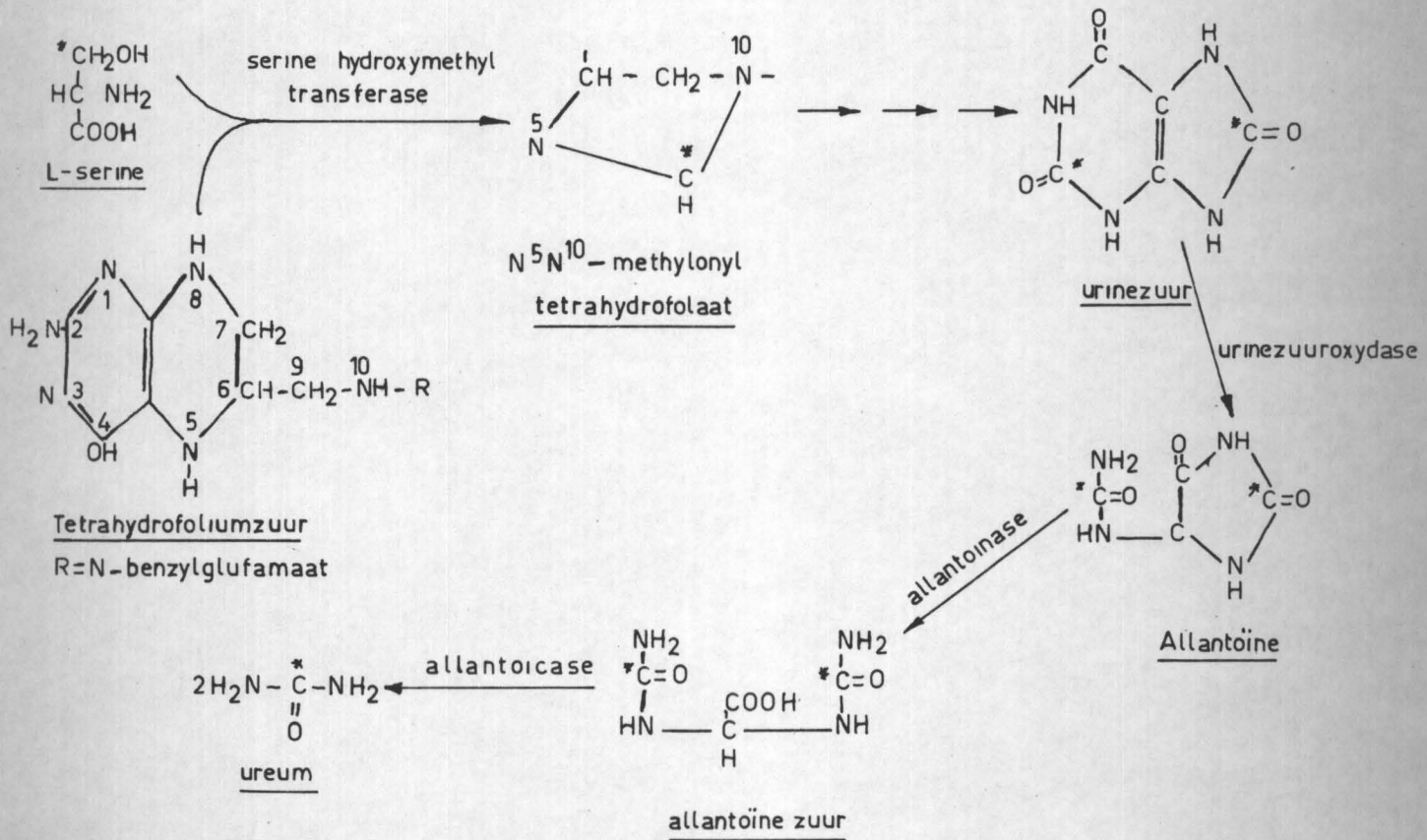


Fig.2— Biosynthesen van ureum

(f) vluchtige stikstofbasen (ammoniak, aminen) ; deze laatste stoffen komen in levende of pas gevangen vis slechts in geringe concentratie voor, maar worden belangrijk tijdens het bederf ; (g) purinederivaten, zoals ADP, ATP, inosine, hypoxanthine.

Zoals reeds in de inleiding vermeld worden deze laatste hier niet verder bestudeerd.

1.2.2.1. Ureum $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$.

Bij de beenvissen komt weinig ureum voor (0,5 tot 15 mg %). Bij de kraakbeenvissen echter is deze base de meest karakteristieke en belangrijkste extraheerbare stikstofverbinding en maakt zowat 45 % van de niet-eiwitstikstof uit. Ureum komt voor in alle weefsels en organen in een concentratie die in dezelfde vis overal relatief gelijk is en tussen 1 en 2 % schommelt.

In het vlees van *S. acanthias* komt volgens Simidu en Oisi (1951) gemiddeld 1,7 % voor.

Voor de biosynthese van ureum zijn twee mogelijke wegen bekend : de ornithine-cyclus en de purine-weg, die in recente jaren ontdekt werd (Brown 1964) (figuur 2).

Bij deze laatste biosynthese wordt vertrokken van L-serine of een andere geschikte formyl-donor en tetrahydrofoliumzuur ; de synthese gaat over urinezuur, allantoïne, allantoïnezuur om uiteindelijk ureum te geven.

Uit proeven door Goldstein (1967) uitgevoerd, bleek de ornithine-cyclus echter meer dan 95 % van de ureum in *S. acanthias* te produceren. Zoals bij de zoogdieren is de ornithine-cyclus werk-

zaam in de lever, waar arginase en de overige noodzakelijke enzymen werden geïdentificeerd. Hunter en Dauphinee (1924), Baldwin (1960) stelden echter vast dat ook in de meeste andere weefsels arginase aangetroffen wordt, maar in lagere concentraties. Campbell (1961) bevestigde deze waarnemingen maar kon de aanwezigheid van ornithine-carbamyl-transferase, een sleutelenzym in de ornithine-cyclus, buiten de lever niet aantonen. Het is daarom twijfelachtig dat in normale omstandigheden significante hoeveelheden ureum buiten de lever gevormd worden.

Niettemin is bij de kraakbeenvissen - in tegenstelling met de beenvissen - ureum in nagenoeg gelijke concentratie in gans het lichaam aanwezig.

1.2.2.2. TMAO en verwante verbindingen.

a) TMAO $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$

De aanwezigheid van TMAO in zeevis werd voor het eerst door Suwa in 1909 vastgesteld, en wel in de doornhaai. Sedertdien werd het in alle onderzochte soorten zeevis gevonden (Beatty 1939 ; Dyer 1952).

Het TMAO is typisch voor zeevis, en komt in zoetwatervissen weinig of niet voor (Dyer 1952 ; Simidu 1961). Het gehalte kan aanzienlijk verschillen volgens de vissoort en de visgrond. De Clupeidae (bv. haring) bevatten gemiddeld ongeveer 40 mg %, de Gadoidae (bv. kabeljauw) \pm 90 mg % (Dyer 1952). De dwarsbekken bevatten een duidelijk hoger gehalte : 190 tot 270 mg N % voor *Squalus acanthias* (Beatty 1939 ; Norris en Benoit 1945 ; Dyer 1952).

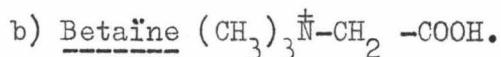
Over de functie en de oorsprong van het TMAO bestaat nog geen volledige zekerheid.

De meeste auteurs zijn het echter eens dat het TMAO bij kraakbeenvissen althans een osmoregelende functie bezit. Het hoger gehalte is hiervoor een aanduiding. Volgens Baldwin (1960) is de bijdrage van het TMAO 20 tot 25 % van de totale osmotische druk van het inwendig medium.

Volgens dezelfde auteur zou het TMAO ook als functie hebben - analoog met ureum - het overvloedige ammonia, dat anders toxisch zou worden, te elimineren. Dit zou gebeuren door transmethylering en oxydatie in de lever en bij sommige soorten ook in de donkere spieren. Dat TMAO in kraakbeenvissen een essentiële metabolische functie bezit die verschilt van de beenvissen wordt ook sterk gesuggereerd door het feit dat het bloed van de Elasmobranchii een relatieve hoge concentratie van dit oxyde bevat, terwijl het praktisch niet voorkomt in het bloed van beenvissen (Benoit en Norris 1945 ; Dyer 1952).

Benoit en Norris (1945), Ogilvie en Warren (1957), Hashimoto en Okaichi (1958 a, b) en Okaichi et al. (1959) bewezen echter dat het TMAO ook van exogene oorsprong kan zijn en uit het voedsel kan worden opgenomen.

Volgens Dyer (1952) en Bilinski (1962) kan ook een deel van het TMAO uit choline gevormd worden. Onderzoekingen van Baker et al. (1960, 1963) en van Bilinski (1964), tenslotte toonden aan dat het TMAO in de vis ook door oxydatie van TMA kan worden gevormd. Reeds geruime tijd is het trouwens bekend dat deze oxydatie ook bij de mens en de zoogdieren plaats grijpt (Suwa 1909 ; Tarr 1941 ; Norris en Benoit 1945 ; Baker en Chaykin 1962).



De kraakbeenvissen bevatten een hoog gehalte aan betaine : gemiddeld 150 mg % terwijl de beenvissen gemiddeld 100 mg % en de

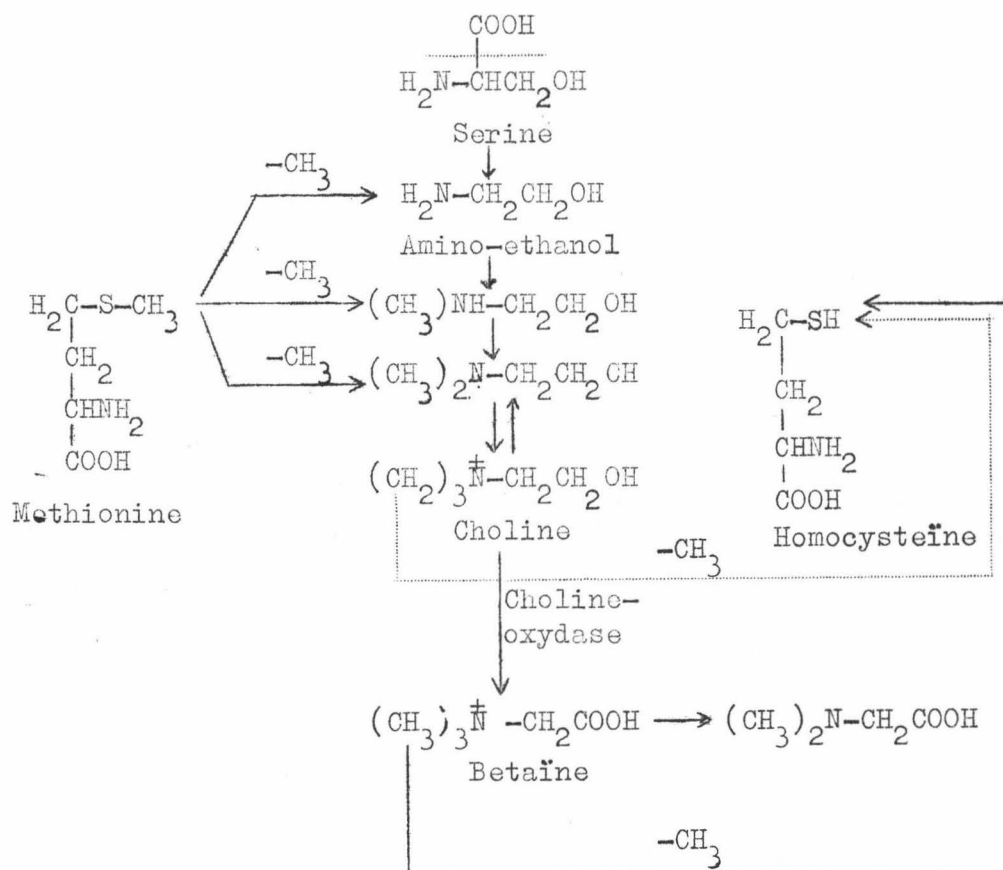
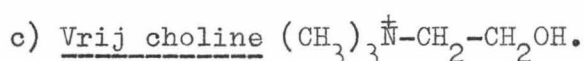


Fig. 3. Biosynthese van choline en betaine (Leutgardt 1963).

zoetwatervissen 10 mg % bevatten. Een overzicht hiervan wordt door Shewan (1951) gegeven. Op te merken valt dat bij alle onderzochte vissoorten uitsluitend glycylobetaïne voorkomt. Een uitzondering hierop vormt de paling, waar γ -butyrobetaïne aangetroffen wordt. Andere betaïnen zoals homarine, trigonelline en stachydrine werden uitsluitend in schaal- en weekdieren gevonden (Shewan 1951).

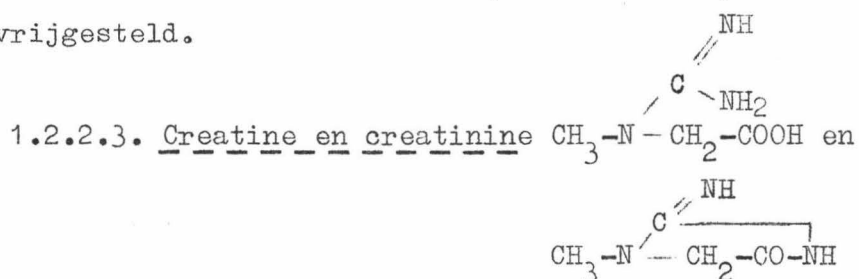
Volgens Bilinski (1964) zou betaïne door oxydatie van choline gevormd worden.



Over choline komen in de literatuur weinig gegevens voor. Volgens Takada en Nishimoto (1958 b) zou het vrij cholinegehalte van dwarsbekken duidelijk hoger liggen dan bij beenvissen. Bij de haai *Sphyrna zygaena* vonden deze auteurs 36 mg % t.o.v. 2 tot 17,5 mg % bij diverse beenvissen.

Vrij choline ontstaat hoofdzakelijk door herhaalde methylering van aminoethanol, dat uit glycine of serine gevormd wordt, door methionine (Leuthardt 1963) (figuur 3).

Het kan ook uit fosfatiden (bv. lecithine) door fosfolipasen worden vrijgesteld.



Creatine is afkomstig van het in de spieren aanwezige fosfocreatine, dat enkele uren na de dood van de vis reeds volledig afgebroken is (Reay et al. 1943).

Het gehalte schommelt voor de diverse vissoorten van 162 tot 639 mg per 100 g. (Reay et al. 1943 ; Shewan 1951 ; Sakaguchi en Simidu 1964). Voor doornhaai geeft Shewan (1951) 350 à 500 mg % op.

Volgens Reay et al. (1943) blijkt er geen systematisch verschil tussen Teleostii en Elasmobranchii te bestaan. Algemeen gezien echter is het gehalte in vis hoger dan in zoogdieren.

Voor oreatinine vonden Sakaguchi en Simidu (1964) gehalten van 24 tot 56 mg % in diverse beenvissen en 59 mg % in de gevlekte haai (*Mustelus manazo* Bleeker).

1.2.2.4. Vrije aminozuren en verwante verbindingen.

Volgens Florkin (1956) zou iedere diersoort een intracellulaire specifieke vrije "aminozurenpool" bezitten met een specifieke gemiddelde concentratie. Deze concentratie is het hoogst bij de dieren die het minst geëvolueerd zijn en daalt naarmate een hogere evolutietrap wordt bereikt. Aldus bevatten de kraakbeenvissen een hoger gehalte aan vrije aminozuren dan de beenvissen.

Het voorkomen van een typische aminozurenpool werd bij diverse vissoorten door Ranke (1959) Schaefer (1959) en Partmann (1965) bevestigd. Deze auteurs wijzen er echter op dat door uitwendige invloeden de individuele waarnemingen dikwijls sterke afwijkingen kunnen vertonen.

Gegevens over vrije aminozuren en verwante verbindingen bij *S. acanthias* worden enkel bij Shewan (1953), Vulf'son (1961) en Schaefer (1962 b) aangetroffen. Alleen Vulf'son voerde de bepalingen kwantitatief uit.

Van de overige Squalidae werden de hondshaai (*Scylliorhinus canicula* L) (Ranke 1959 ; Schaefer 1962 b) en de gevlekte haai (*Mustelus manazo* Bleeker) (Sakaguchi en Simidu 1964) onderzocht.

Deze gegevens werden in tabel 1 verzameld.

Tabel 1 - Vrije aminozuren in *Squalus acanthias* L. en verwante soorten (a).

Aminozuur	Shewan 1953 (b)	Schaefer 1962 b (b)	Vulf'son 1961 (b)	Ranke 1959 (b)	Schaefer 1962 b (c)	Sakaguchi 1964 (d)
glycine	++	+++	50	+	++++	16,8
sarcosine	++		99			
α -alanine	++	+++	34		+++	23,8
β -alanine	+++	+++	105	+	+++	
valine	sp.	+			++	sp.
leucine/isoleucine	sp.		42		+	7,1
serine	+		21			4,9
threonine	+	+++	14		+++	12,1
cysteine/cystine		+++		+	++	29,9
taurine		++		+	+++	28,0
methionine		0			0	14,0
asparaginezuur	sp.	++	15	++	++	5,9
glutaminezuur	sp.	+++	26		++	2,7
lysine	sp.	++++		+++	+++	0,2
arginine	sp.	+	50	++	+++	9,5
ornithine			25			
histidine		++	0	+	+	63,6
fenylalanine		0	22		0	2,1
tyrosine		0	0		0	1,2
tryptofaan		0				sp.
proline	+	++++		+++	+++	
hydroxyproline		+			+	
α -aminoboterzuur		+			+	
β -aminoboterzuur		0			+++	
γ -aminoboterzuur		0			0	

(a) sp. : spoor

+ : weinig

++ : middelmatig

+++ : veel

++++ : zeer veel

(kwantitatieve gegevens in mg per 100 g visvlees ; niet ingevulde gegevens werden door de auteur niet vermeld).

(b) Doornhaai (*Squalus acanthias* L)(c) Hondshaai (*Scylliorhinus canicula* L)(d) Gevlekte haai (*Mustelus manazo* Bleeker)

1.2.3. Veranderingen in de extraheerbare stikstofffractie post-mortem.

Reeds in 1909 stelde Bruns vast dat het vlees en de erin aanwezige biologische vloeistoffen van pas gevangen, gezonde vis, steriel zijn. Dit werd sindsdien herhaaldelijk bevestigd (Maltshewsky en Partmann 1950 ; Heiss 1954 ; Shewan 1962). Het slijm, de kieuwen en de ingewanden hebben echter een sterke kiembelasting, die varieert tussen 10^2 en 10^5 per cm^2 huid of kieuwweefsel en tussen 10^3 en 10^8 per ml darmvloeistof (Shewan 1949, 1961).

Na de dood van de vis wordt het inwendig elektrodynamisch evenwicht van de weefsels verbroken, en de membranen die tot dan toe semi-permeabel waren kunnen de diffusie van biologische vloeistoffen en het indringen van bacteriën niet meer beletten.

Het bederf van de vis geschiedt zoals bij de andere dieren autolytisch en bacterieel. Bij de autolyse geschiedt de ontbinding van de dierlijke weefsels door de werking van de in de cellen aanwezige (endogene) enzymen. De autolyse staat tegenover de bacteriële ontbinding die geschiedt door exogene enzymen. Wij beperken ons hier tot de autolyse van de stikstofsubstraten met uitzondering van purinebasen.

1.2.3.1. Autolyse.

Willstätter en Baumann (1928) gaven de naam "kathepsine" aan het geheel van de intracellulaire proteolytische enzymen. De betekenis van de autolyse voor het bederf van vis is nog steeds een veel omstreden vraag. Meestal is het immers zo dat men niet altijd met zekerheid kan uitmaken of bepaalde afbraakprodukten uitsluitend van autolytische oorsprong zijn dan wel gedeeltelijk of geheel bacterieel worden gevormd.

Om het aandeel van de intracellulaire enzymen te kunnen bepalen, moet alle bakteriële proliferatie worden uitgeschakeld. Dit kan gebeuren hetzij door het gebruik van antiseptica zoals tolueen of chloroform, van antibiotica, van ioniserende stralen of door het uitsnijden in aseptische omstandigheden van steriele blokken visvlees. Al deze technieken hebben nadelen, waarvan het voornaamste is dat het bederf - zij het autolytisch - niet meer in "natuurlijke" omstandigheden plaats grijpt. Een overzicht hiervan wordt door Jones (1962) gegeven.

De meeste auteurs, die diverse soorten beenvissen onderzochten geven echter aan dat de autolyse bij 0° C gering is, wanneer men het gehalte aan vrije aminozuren doseert (Proctor et al. 1950 ; Partmann 1952 ; Hodgkiss en Jones 1955 ; Shewan en Jones 1957 ; Liston 1965 ; Partmann 1966). Zij zijn van oordeel dat de autolyse van weinig betekenis is voor het bederf van vis.

Andere auteurs benaderden het probleem van de autolyse enzymologisch. Bailey et al. (1942) vonden dat de proteolytische activiteit t.o.v. hemaglobine als substraat het sterkst was bij pH 4, dus tamelijk verwijderd van de normale post-rigor pH van vis nl. 6 tot 7.

Siebert (1958) bestudeerde de werking van kathepsinen en neutrale endopeptidasen bij 37° C en diverse vissen en vond in vergelijking met zoogdieren (rund, varken, konijn en rat) per gram weefsel vijfmaal meer kathepsinen in de lever, zesmaal meer in de milt en tienmaal meer in de muskulatuur van vissen (460 à 1035 μ g tyr/h/g). Op te merken valt echter dat de vissen een temperatuur van \pm 30° C lager hebben dan de zoogdieren. Wanneer men rekening houdt met de Q_{10} -factor wordt de activiteit van de vissen bij 7° C ongeveer gelijk aan deze van de zoogdieren.

Neutrale endopeptidasen werden in tegenstelling met de zoogdieren niet in steriele vis aangetroffen.

Jones (1955, 1956, 1959 b) stelde tijdens het bewaren van steriele kabeljauw een gevoelige vermeerdering van l-methylhistidine en β -alanine vast. Hij kon aantonen dat deze aminozuren afkomstig waren van het dipeptide anserine dat door een endogeen enzym gesplitst werd. Hij noemde het enzym anserinase. Het anserinase zou enkel in Gadoïdsoorten en bepaalde Salmonidae voorkomen (Lukton en Olcott 1958).

Schmitt et al. (1966) bestudeerden de dipeptidase-aktiviteit in diverse vissen t.o.v. 27 verschillende dipeptiden als substraat. Algemeen gezien overtreft de dipeptidase-aktiviteit in visweefsels aanzienlijk deze van zoogdieren. Van alle bekende dipeptidasen vertoont glycyl-L-leucine dipeptidase de hoogste aktiviteit. De specificiteit blijkt echter tamelijk breed te zijn en het enzym kan talrijke homologen van glycyl-L-leucine afbreken. Verder is ook van betekenis L-alanylglycine dipeptidase.

Siebert et al. (1964) bestudeerden verder de enzymen van het aminozuurmetabolisme in kabeljauw. Verschillende transaminasen vertoonden een sterke aktiviteit. Aminozuurdecarboxylasen ontbraken praktisch volledig waardoor de vorming van aminen door toedoen van endogene enzymen hoogstwaarschijnlijk niet plaatsgrijpt.

Evenmin werden oxydatieve enzymen (monoamino-oxydasen) vastgesteld.

1.2.3.2. Bakterieel bederf.

De bakteriële flora kan kwalitatief en kwantitatief aanzienlijk variëren niet alleen van vis tot vis, maar ook tijdens het bederf

zelf. In dit proefschrift wordt hier niet verder op ingegaan. Er kan er enkel op gewezen worden dat de bacteriën overwegend psychrofiele gram -negatieve staafjes zijn van de soorten *Pseudomonas*, *Achromobacter* en *Flavobacterium* (Shewan 1962).

De hoofdwegen voor het indringen van de mikro-organismen blijken te lopen van de kieuwen en de nieren in het vlees via het vasculair systeem enerzijds en rechtstreeks door de huid en het buikvlies anderzijds.

Het tijdstip waarop bacteriën in het steriel visvlees dringen blijkt wisselvallig. Volgens Shewan (1962) zou het buikvlies steriel blijven tot de wanden van de maag en de ingewanden geperforceerd zijn. Dit zou bij 0° C na 7 à 9 dagen gebeuren.

Er is meningsverschil wat betreft de snelheid waarmee de bacteriën door de huid treden. Sommige auteurs reporteren dat het visvlees gedurende minstens 10 dagen steriel blijft (Dyer et al. 1946) terwijl andere opgeven dat de besmetting korte tijd na de dood kan beginnen (Lücke en Frercks 1940 ; Maltschewsky en Partmann 1951). Shewan (1962) stelde vast dat vanaf de tweede dag post mortem enkele bacteriën in het visvlees, voornamelijk langs de zijlijn, aanwezig zijn maar dat de grote massa van het visvlees echter verschillende dagen steriel blijft.

De intensiteit en de oriëntatie van het bacterieel bederf varieert volgens het min of meer proteolytisch karakter van de mikroflora, de initiale belasting en de reproductie- en diffusiemogelijkheden in het visvlees. Zij is vooral zeer gevoelig aan de temperaturomstandigheden, daar deze de aktiviteit en de groei van de bacteriën beïnvloedt en daarenboven onrechtstreeks een selektie in de soorten kan veroorzaken (Soudan 1965).

1.2.3.3. Tijdens het bederf gevormde afbraakprodukten.

Door de autolyse en de bakteriële werking worden de diverse stikstofs substraten tijdens het bederf in meer of minder sterke mate afgebroken. De voornaamste stikstofafbraakprodukten zijn trimethylamine (TMA) ammoniak en aminen.

1.2.3.3.1. TMA.

Door Suwa (1909) werd voor het eerst vastgesteld dat bacteriën het in zeevissen aanwezige TMAO tot TMA reduceren. Beatty en Gibbons (1937) en Beatty (1938) toonden verder aan dat het tijdens het bederf van vis gevormde TMA uitsluitend van bakteriële oorsprong is. In steriel visextract en visvlees greep geen reductie plaats. Beatty (1938) stelde daarenboven vast dat minstens 94 % van het gevormde TMA van TMAO afkomstig moet zijn.

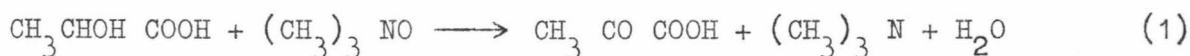
Tarr (1939) vond dat zowat 10 % van de op vis aanwezige mikro-organismen in staat zijn TMAO te reduceren en hiervoor een enzym bezitten dat het oxyde aktiveert en het als waterstofacceptor geschikt maakt. Watson (1939) kwam tot hetzelfde besluit en suggereerde het enzym "trimethylamineoxydase" te noemen. Tarr (1940) bestudeerde de specificiteit van het enzym t.o.v. talrijke substraten. Hij kwam tot de konklusie dat het enzym de drie laagste verbindingen van de homologe reeks met algemene structuur $R_3N = O$ (TMAO, triethylamineoxyde en tri-n-propylamineoxyde) aktiveert.

Verbindingen die de groep $(CH_3)_3 N \begin{array}{l} \diagup O- \\ \diagdown C \equiv \end{array}$ bevatten (betaïne, choline) worden niet geactiveerd. Om deze reden stelde Tarr (1940) voor het enzym "triamineoxydase" te noemen.

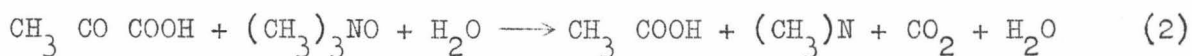
De reductie van TMAO tot TMA geschiedt niet door het triamineoxydase alleen ; ook een dehydrogenase is noodzakelijk. Verschil-

lende dehydrogenasesystemen met lager redoxpotentiaal dan het stelsel TMAO - TMA kunnen in aanmerking komen (Tarr 1939 ; Castell en Snow 1951). Voor dit stelsel geeft Vaisey (1956) een normaal redoxpotentiaal van 120 tot 140 mV bij pH 7,2 op.

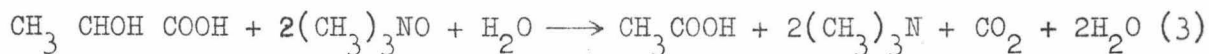
Als waterstofdonor treedt vooral melkzuur op, dat hoofdzakelijk door glycogenolyse ontstaat. In mindere mate komen ook pyrodruivenzuur, gluciden en glycogeen in aanmerking (Beatty 1938 ; Watson 1939 ; Neilands 1945). Watson (1939) bestudeerde de reductie van TMAO in aanwezigheid van melkzuur en stelde vast dat de reactie als volgt verloopt :



Het gevormde pyrodruivenzuur wordt echter onmiddellijk verder geoxydeerd volgens :



Krebbs (1937) stelde vast dat H_2O aan de reactie deelneemt. Een intermediar TMAO-hydraat wordt gevormd. De zuurstof van TMAO wordt inderdaad niet gebonden aan de ketogroep van het pyrodruivenzuur, maar het neemt de waterstof van het hydraat op om één molekule H_2O te vormen. De globale reactie is dan ook :



Een ophoping van pyrodruivenzuur volgens reactie (1) is inderdaad niet mogelijk daar het pyrodruivenzuur sneller geoxydeerd wordt dan het melkzuur (Watson 1939).

Kleine hoeveelheden TMA kunnen ook door bakteriële aktie uit choline gevormd worden (Dyer en Wood 1947 ; Takada en Nishimoto 1958). Deze reaktie blijkt bij voorkeur te gebeuren wanneer weinig of geen TMAO aanwezig is, zoals bv. in zoetwatervissen (Takada en Nishimoto 1958). De hiervoor verantwoordelijke bacteriën kunnen geen TMA uit betaine vormen (Dyer en Wood 1947 ; Campbell en Williams 1951 ; Eddy 1953).

1.2.3.3.2. Mono- en dimethylamine.

Monomethylamine werd in diverse beenvissen sporadisch in concentraties van enkele mg N % aangetroffen. Dimethylamine zou in doornhaai tijdens het bederf niet gevormd worden (Soudan 1965).

1.2.3.3.3. Ammoniak en aminen.

Ammoniak kan tijdens het bederf van de vis door verschillende reakties gevormd worden. Bij de dwarsbekken ontstaat de grootste hoeveelheid ammoniak door afbraak van het overvloedig aanwezig ureum. Verder ontstaat het door desaminering van de aminozuren en verwante verbindingen, door oxydatie van aminen en door afbraak van nucleïnebasen. Tenslotte dient opgemerkt dat vrije ammoniak ook in de levende vis optreedt ten gevolge van de normale desamineringen van het celmetabolisme, zoals bv. de overgang adenine - hypoxanthine. De concentratie schommelt tussen 6 en 36 mg in Elasmobranchii (Soudan 1965).

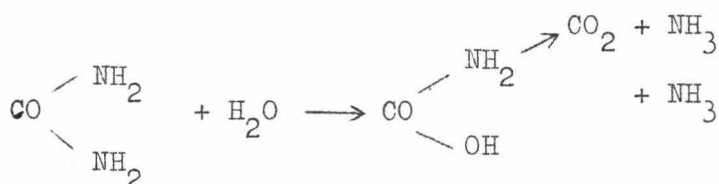
Simidu en Oisi (1951) vonden voor *S. asanthias* een gemiddelde waarde van 23 mg N %.

a) Afbraak van ureum.

De afbraak van ureum wordt gekatalyseerd door een enzym, de urease. Simidu en Oisi (1951 b,c) konden aantonen dat het enzym praktisch uitsluitend van bakteriële oorsprong is ; zij vonden slechts

sporen urease in de spierweefsels van de haaiachtigen.

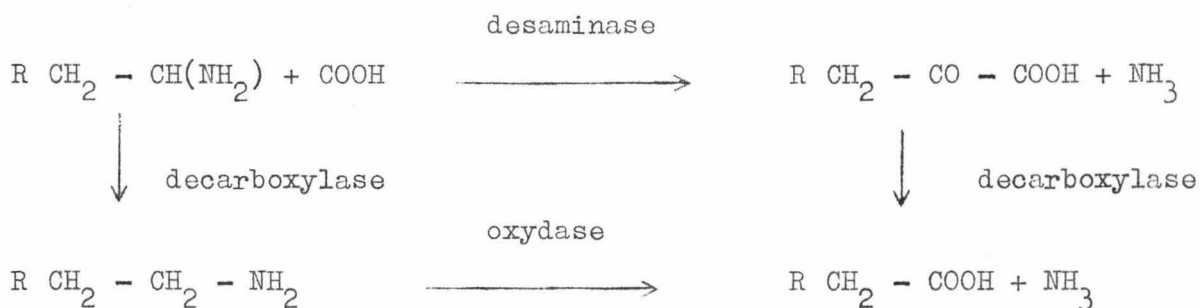
Volgens Wang en Tarr (1955), die een isotopentechniek gebruikten, zou de hydrolyse van ureum door bemiddeling van urease via carbaminezuur gebeuren.



Gedurende de afbraak van ureum wordt een parallele stijging van de hoeveelheid ammoniak waargenomen (Simidu en Oisi 1951 b).

b) Afbraak van aminozuren en aminen.

Het schema van de bakteriële afbraak kan als volgt worden voorgesteld (Soudan 1965) :



Terwijl aldus een deel van de aminozuren gedesamineerd wordt met vorming van ketozuren en lagere vetzuren, wordt een andere deel gedecarboxyleerd met vorming van aminen, waaronder vooral het iso-amylamine, putresceïne, cadaverine, tyramine, tryptamine en histamine te vermelden zijn, respektievelijk afkomstig van leucine, ornithine, lysine, tyrosine, tryptofaan en histidine.

Naarmate het bederf vordert en het midden meer alkalisch wordt, worden deze aminen door de bacteriën geoxydeerd met vrijmaking van ammoniak.

De hoofdweg voor de afbraak van de aminozuren blijkt echter wel de oxydatieve desaminering te zijn. Decarboxylering treedt in veel mindere mate en slechts in de latere stadia van het bederf op (Dyer en Mounsey 1945 ; Hughes 1958).

Beatty en Collins (1939) stelden daarenboven vast dat de desaminering van de vrije aminozuren slechts na een uitgesproken vorming van TMA plaats greep.

1.2.3.3.4. Choline en betaïne.

Over het afbraakmechanisme van choline en betaïne in vis is zeer weinig bekend. Men kan er echter op wijzen dat het metabolisme van deze twee kwaternaire ammoniumbasen zeer verwant is. Shieh (1964, 1966) vond dat in aëroob midden een mariene bacterie, *Achromobacter cholinophagum*, in staat is het choline af te breken. Hij kon aantonen dat het choline eerst tot betaïne wordt geoxydeerd. Het betaïne wordt dan tot formaldehyde en dimethylglycine gedemethyleerd. Op te merken valt dat geen methionine wordt gevormd door transmethylering met homocysteïne, zoals in hogere dieren werd vastgesteld. Het dimethylglycine wordt tot sarcosine en formaldehyde geoxydeerd. Het sarcosine wordt niet tot glycine geoxydeerd zoals in zoogdieren werd vastgesteld (Soloway en Stetten 1953), maar in serine omgezet. Het mechanisme van deze laatste omzetting is duister. Het serine tenslotte wordt gedesamineerd tot ammoniak en pyrodruivenzuur. In anaërobe omstandigheden werd vastgesteld dat bacteriën in staat zijn choline en betaïne tot trimethylamine af te breken (Dyer en Wood 1947 ; Hayward en Stadtman 1959).

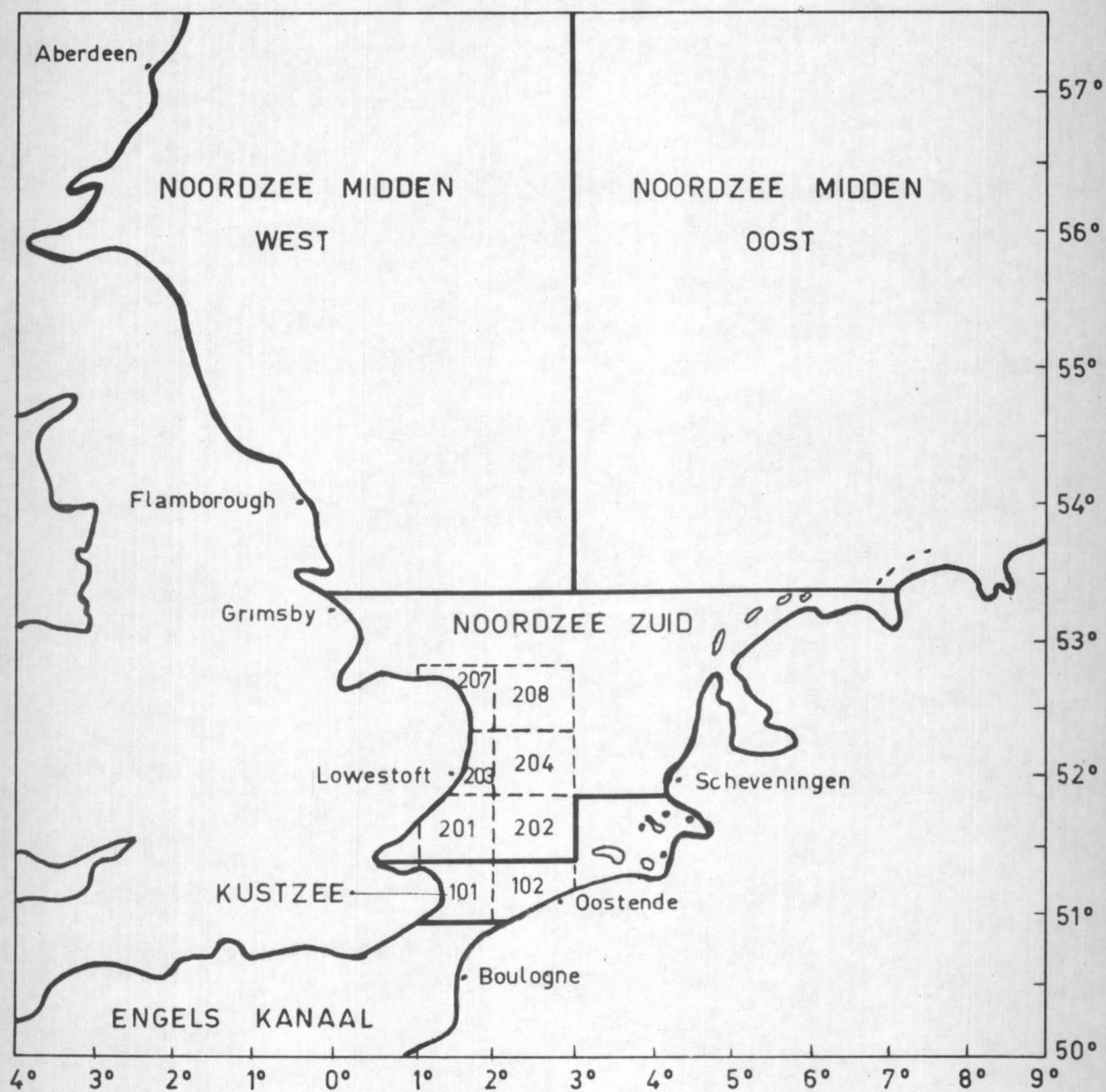


Fig. 4 - Visserijsectoren waar *S. acanthias* werd gevist

HOOFDSTUK 2 - METODEN EN MATERIALEN.

2.1. Proefvis.

De voor de proeven gebruikte *S. acanthias* was uitsluitend afkomstig van de Belgische visserijsectoren "Noordzee-Zuid" en "Kust-zee" (overeenkomend met de internationale sektor IV C). De vissen behoorden dan ook tot de in 1.1. vermelde "Kanaalpopulatie". Meer bepaald kwam het gebied gelegen tussen 51° en 53° NB en 1° en 3° OL, hetzij de visserijvakken 101, 102, 201, 202, 203, 204, 207 en 208 in aanmerking (figuur 4). In dit gebied varieert de diepte tussen 2 en 50 m.

De vissen werden met de bordentreil volgens de normale visserijpraktijk gevangen (duur der slepen : 2 tot 3 uur) zij werden dan onmiddellijk in afwisselende lagen ijs en vis in het visruim opgeslagen. Speciale aandacht werd besteed aan het zorgvuldig wassen van de vis en het vermijden van kneuzingen en kwetsuren door te ruwe behandeling.

Onmiddellijk na de aankomst in de vissershaven van Oostende werd de vis naar het laboratorium gebracht en bij 1° C in ijs gestockeerd indien de voorziene proef niet onmiddellijk kon aanvatten.

Alle doornhaaien waren sedert 12 tot 36 u gevangen bij het begin van de proeven.

Daar het nemen van de visweefselmonsters meestal relatief lang duurde werd deze bewerking in een op ongeveer 5° C gekoeld laboratorium verricht, ten einde schadelijke temperatuurstijgingen te vermijden.

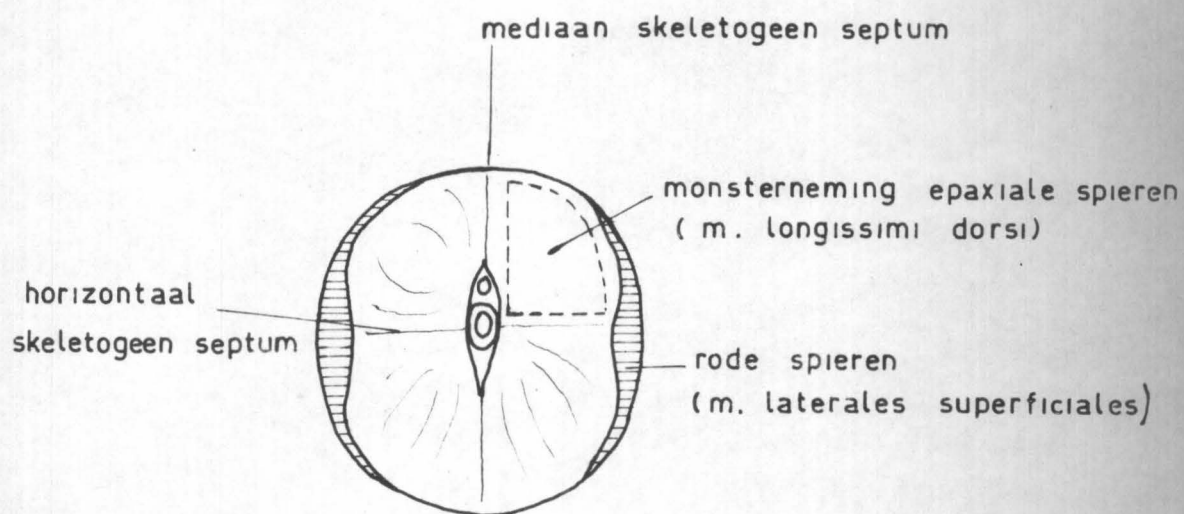
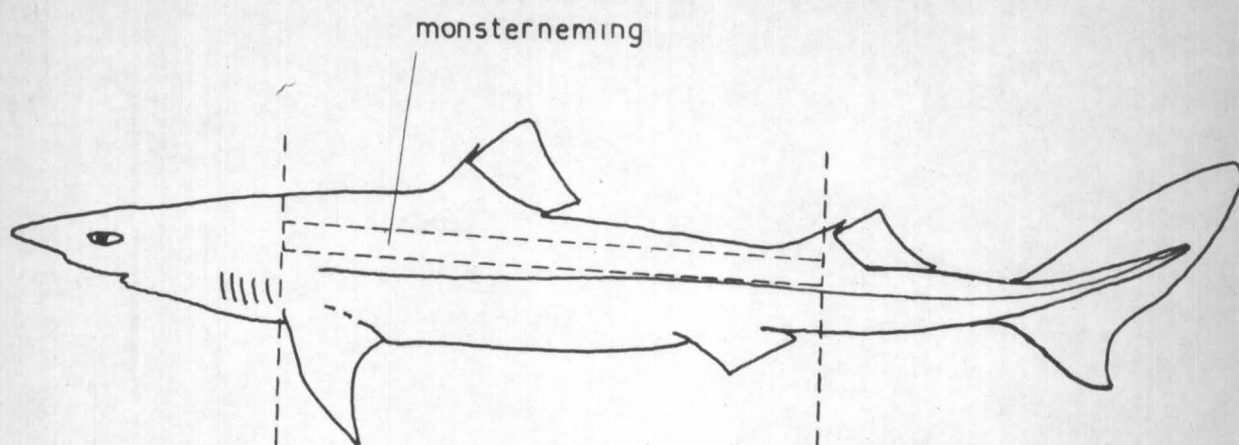


Fig. 5 - PLAATS VAN DE MONSTERNEMING

De vissen werden opnieuw zorgvuldig met ijskoud water ($\pm 2^{\circ} \text{C}$) gespoeld. Tenzij anders vermeld werd dan een strook van de epaxiale spieren (musculi longissimi dorsi) over de grootste lengte van de vis nl. van de voorste buikvin tot de achterste rugdoorn, uitgesneden (figuur 5). De huid en de rode spieren (musculi laterales superficiales) werden zorgvuldig verwijderd. Volgens de grootte van de vis bedroeg het monster 100 tot 200 g.

Voor de meeste analytische methoden werd de vis tenslotte tweemaal in een elektrische vleesmolen gemalen en zorgvuldig doorengemengd. Wanneer bepaalde analyses niet onmiddellijk konden worden uitgevoerd, werd een hoeveelheid vismonster snel in een tunnelvriezer diepgevroren en bij -30°C bewaard.

2.2. Analytische methoden.

Door de aard van de in deze thesis beschreven proeven dienden talrijke analyses in een relatief beperkte tijd te worden uitgevoerd. Om deze reden was het noodzakelijk zoveel mogelijk methoden te gebruiken die op vlugge en eenvoudige wijze konden worden toegepast. Niettemin moesten zij voldoende gevoelig en nauwkeurig zijn.

Enkele methoden konden praktisch ongewijzigd worden overgenomen. In dit geval wordt enkel het principe vermeld. De meeste echter dienden aan de bijzondere eisen van het onderzoek op doornhaai te worden aangepast. Alle methoden werden op hun bruikbaarheid en reproduceerbaarheid onderzocht.

Voor de kolorimetrische bepalingen werden ofwel een Coleman Junior spektrofotometer met ronde cellen van 19 mm ofwel een Vitatron Model UC 100 kolorimeter met vierkante kuvetten van 10 mm gebruikt.

De meeste invloedsfactoren werden met behulp van de methode met gepaarde vergelijkingen (variante van de t-test) statistisch getoetst volgens :

$$t = \frac{\bar{d}}{s/\sqrt{n}} \quad \text{met } (n - 1 \text{ vrijheidsgraden}), \text{ waarbij}$$

\bar{d} = gemiddeld verschil tussen de paarsgewijze uitgevoerde proeven

s = standaardafwijking van de verschillen

n = aantal paren

Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methoden werd de standaardafwijking uit de in meervoud uitgevoerde proeven berekend volgens de range-methode (Bauer 1960) :

$$s = \frac{\bar{d}}{C_n}, \text{ waarbij}$$

\bar{d} = gemiddeld verschil tussen hoogste en laagste proefresultaat

C_n = koëfficiënt afhankelijk van het aantal herhalingen (n) ; C is respectievelijk 1,13 voor $n = 2$; 1,69 voor $n = 3$ en 2,06 voor $n = 4$.

Voor het vergelijken van de standaardafwijkingen ten einde eventuele verschillen in reproduceerbaarheid op hun significantie te toetsen werd de F-test gebruikt wanneer slechts twee reeksen van waarnemingen aanwezig waren. Voor meer dan twee reeksen werd de Hartley-test (Hartly 1950) toegepast.

Men neemt de grootste (s_{\max}) en de kleinste standaardafwijking (s_{\min}) en berekent de verhouding s_{\max}^2/s_{\min}^2 . Deze waarde mag een bepaalde theoretische waarde, afhankelijk van het aantal te vergelijken standaardafwijkingen en het aantal vrijheidsgraden, niet overtreffen.

2.2.1. Ammoniak.

Voor de bepaling van vrije ammoniak in biologische vloeistoffen heeft de methode van Conway (1962) brede toepassing gevonden. Alhoewel relatief eenvoudig en zeer nauwkeurig bezit zij toch ernstige nadelen, nl. (a) het verwijderen van het vet, dat noodzakelijk is voor de luchtdichtheid, is niet altijd eenvoudig, (b) de diffusieduur is relatief lang, (c) het gebruik van kolorimetrie als doseringstechniek vereist het kwantitatief overhevelen van de absorptievloeistof, (d) de cel is relatief duur.

Om deze reden werd gepoogd een gewijzigde mikrodiffusie-techniek toe te passen, die deze nadelen niet zou bezitten. Na talrijke oriënterende proeven bleek dat de methode van Seligson en Seligson (1951), die werd voorgesteld om de vrije ammoniak in bloed te bepalen, aan vis kon aangepast worden. Een vroegere mededeling verscheen hierover (Vyncke en Merlevede 1963). Sedertdien werd de methode echter nog geperfectioneerd (Vyncke 1968).

2.2.1.1. Reagentia.

Alle oplossingen dienen met ammoniakvrij water bereid te worden. Voor met ionenwisselaars gedemineraliseerd water is deze voorwaarde vervuld. Gewoon gedestilleerd water moet door een kolom Amberlite Monobed III of een analoog hars worden gezuiverd.

Nesslerreagens : volgende modifikatie bleek de grootste stabiliteit en gevoeligheid te geven :

Oplossing 1 : los 40 g HgI_2 p.a. en 30 g KI p.a. in 100 ml water.

Oplossing 2 : los 95 g NaOH p.a. in 1.000 ml water.

Meng 1 en 2 en laat drie dagen staan. Dekanteer de klare bovenstaande vloeistof in een bruine fles en bewaar in het donker.

Verdun 1 : 25 voor gebruik. De stockoplossing is drie maanden houdbaar.

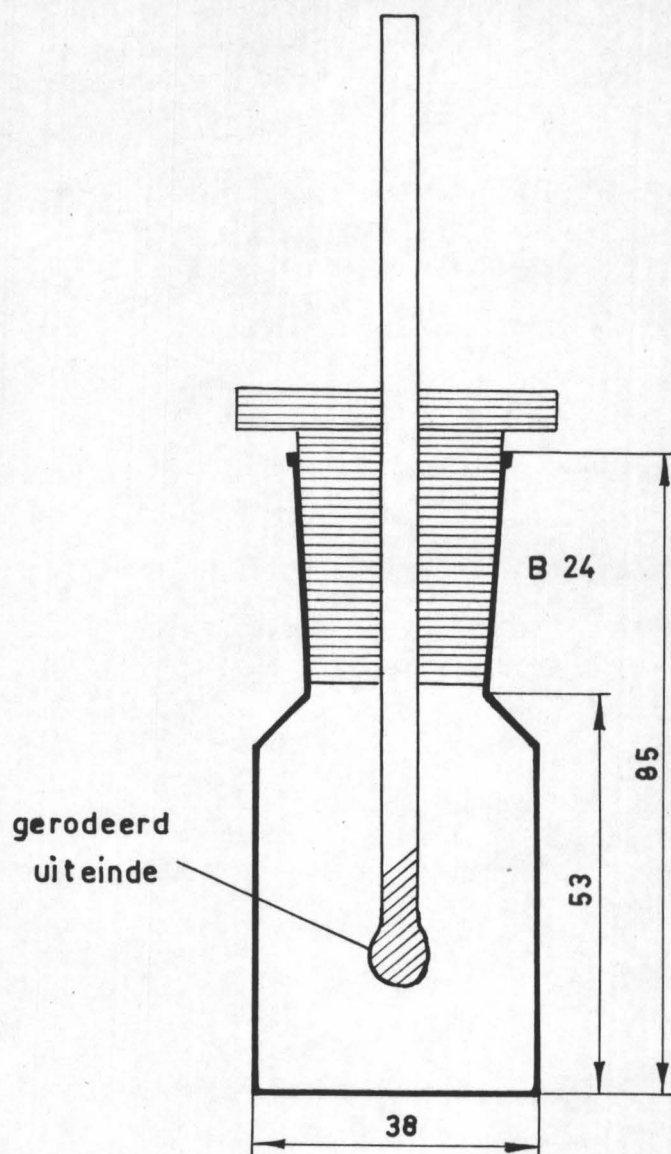


Fig. 6 — Mikrodiffusiefles
(afmetingen in mm)

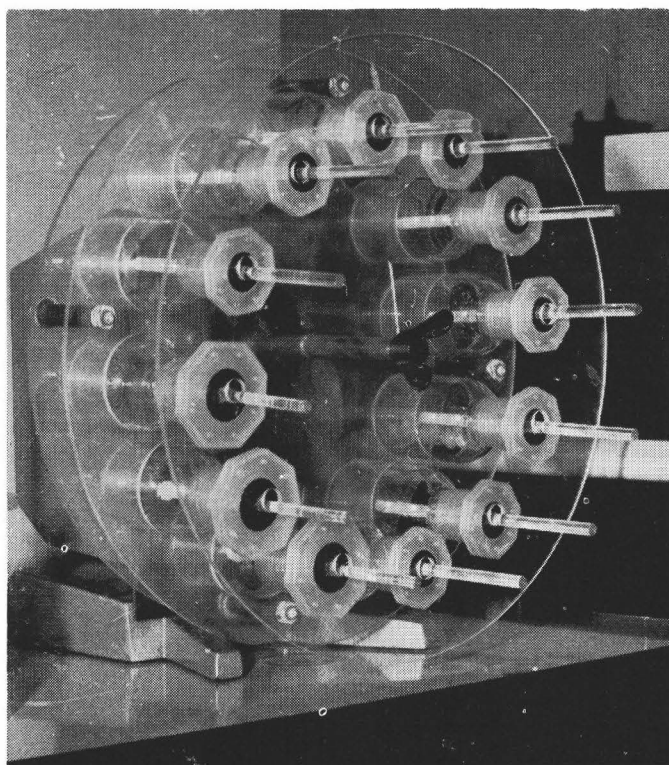


Fig. 7 — Mikrodifusierotator in vertikale stand

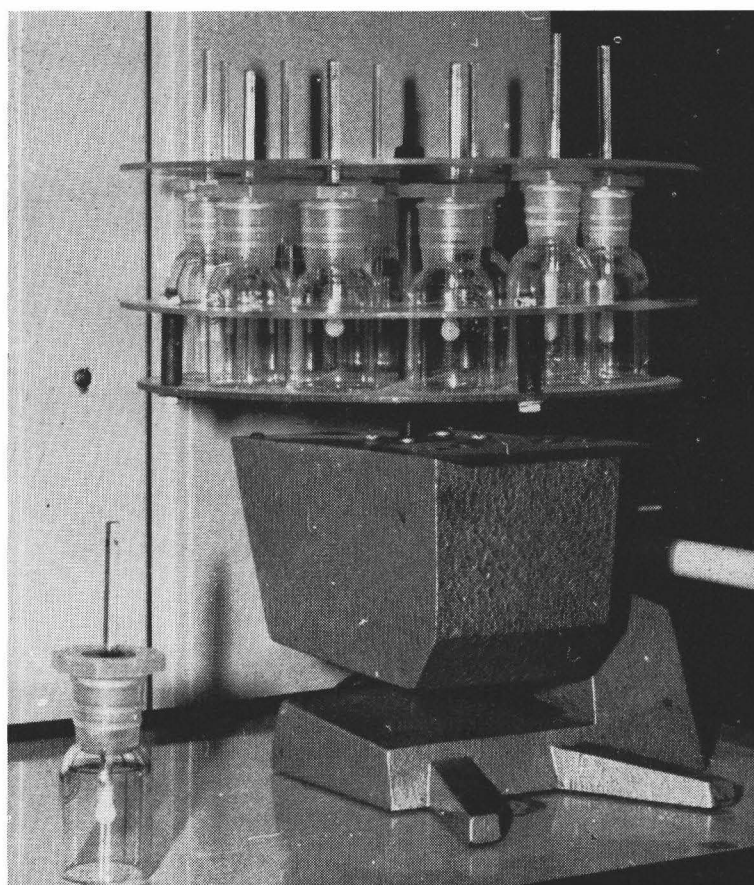


Fig. 8 — Mikrodifusierotator in horizontale stand

2.2.1.2. Apparatuur.

- Mikrodiffusieflesjes.

De door Seligson en Seligson (1951) voorgestelde penicillineflesjes werden na talrijke modifikaties uiteindelijk vervangen door flesjes met geroodeerde hals (B24), voorzien van een doorboorde polyethyleen stop met glazen staaf. De staaf wordt vastgekleefd met gewone universeellijm ; hierdoor is de stop tevens hermetisch dicht. Het uiteinde van de staaf is bolvormig verdikt en geroodeerd. De afmetingen zijn in figuur 6 vermeld. Met deze flesjes wordt het inbrengen en het verwijderen van de staaf zonder de wanden te raken door de B24-opening vergemakkelijkt. Deze opening is maximaal, daar men rekening moet houden met het relatief kleine volume van de diffusiefles.

- Mikrodiffusierotator.

De "Multi-Purpose Rotator" Model 150 V (Scientific Industries, New York, U.S.A.) werd eerst beproefd, doch het vasthechtingssysteem met klemmen voor de flesjes bleek niet geschikt te zijn. De rotatiekop werd dan ook vervangen door een zelfontworpen model (figuur 7). Dit model bestaat uit drie schijven uit plexiglas van 27 cm diameter. De eerste schijf dient als grondplaat voor de flesjes ; de tweede is voorzien van 12 openingen van 4 cm diameter. Deze twee schijven zijn op de centrale as, op een afstand van 3,5 cm van elkaar bevestigd. De derde plaat heeft 12 openingen van 1 cm diameter die juist over de glazen staven passen en komt op de stoppen van de flesjes te rusten. Het geheel wordt door middel van een vlindermoer vastgedraaid. De flesjes staan aldus in de rotatiekop stevig vast en zijn terzelfdertijd hermetisch gesloten. De rotator kan zowel in horizontale als in verticale stand gedraaid worden (figuren 7 en 8).

2.2.1.3. Werkwijze.

Tien g vis worden gedurende 2 min. met 400 ml ammoniakvrij water gehomogeniseerd ; 1 ml van de bovenstaande vloeistof (filtreren is overbodig) wordt in een mikrodifusieflesje gepipeteerd. Eén ml verzadigde kaliumkarbonaatoplossing wordt toegevoegd en onmiddellijk daarop wordt het uiteinde van de glazen staaf over \pm 5 mm in 1 N zwavelzuur gedompeld ; het overtollige zuur wordt afgeschud en de stop wordt op het flesje geplaatst zonder de wanden te raken. De flesjes worden in horizontale stand in de rotator geplaatst en vastgeschroefd.

De rotatiekop wordt in verticale positie gewenteld, de motor wordt aangeschakeld en op 50 toeren per minuut geregeld. Na 30 min wordt het roteren stopgezet.

De staafjes worden uit de flesjes verwijderd, zonder de wanden te raken en in een beker van 10 ml, die 5 ml Nesslerreagens 1 : 25 bevat, geroerd. De extinktie wordt bij 400 nm gemeten.

2.2.1.4. Invloedsfactoren.

Alle mikrodifusiebepalingen moeten in strikt gestandaardiseerde omstandigheden worden uitgevoerd. Het volume van de diffusieflesjes, de diffusieoppervlakten en de rotatiesnelheid kunnen gemakkelijk konstant gehouden worden en zijn daarom van minder belang. Sterke variaties in kamertemperatuur dienen echter vermeden te worden, vermits de diffusieduur hierdoor beïnvloed wordt.

Het toevoegen van 1 ml verzadigde kaliumkarbonaatoplossing brengt de pH op 12,2 tot 12,3, hetgeen een optimale diffusie verzekert.

De diffusie is na ongeveer 75 min beëindigd, maar ongeveer 92 % en 98 % (\pm 1 %) ammoniak komen respektievelijk in 15 en 30 min over. Er valt op te merken, dat wanneer de flesjes niet geroteerd worden, de diffusie 18 tot 24 uur duurt.

De diffusiecurven zijn zeer reproduceerbaar en in principe kan dan ook een korte diffusieduur (bv. 10 min) genomen worden. Het is echter aan te raden 30 min te nemen, daar in deze omstandigheden de rotatieduur niet nauwkeurig moet worden in acht genomen. Daarenboven zijn, in dit geval, kleine fluktuaties in draaisnelheid zonder belang (Seligson en Seligson 1951).

De extinktie van de oranje-gele Nessleroplossing bleek gedurende ca 30 min. stabiel te zijn. Wanneer de kolorimetrische bepaling niet onmiddellijk kan geschieden, moet de oplossing van de lucht afgeschermd worden. In 30 min vermindert de extinktie anders met ongeveer 8 %.

2.2.1.5. Storende bestanddelen.

Naast ammoniak produceren ook diverse andere verbindingen een kleur met het Nesslerreagens. Voor vis betreft het vooral dimethylamine en trimethylamine, die samen met ammoniak door de alkalisering vrijkomen, diffunderen en als sulfaat op het staafje worden gebonden. Uit controleproeven uitgevoerd met 10 μ g N van beide verbindingen, overeenkomend met 40 mg N per 100 g vis, bleek dat in de gegeven omstandigheden het Nesslerreagens niet gekleurd werd, en dat het blijkbaar niet gevoelig genoeg is voor deze verbindingen in deze concentraties. Dimethylamine en trimethylamine storen dan ook de ammoniakbepaling niet.

Uit controleproeven, uitgevoerd met 500 μ g ureum bleek geen ammoniak vrij te komen, hetgeen ongetwijfeld aan de zeer korte diffusieduur te wijten is. Dit is een belangrijk voordeel, daar de methode aldus toelaat vrije ammoniak te bepalen in ureumrijke vissen, hetgeen met de meeste andere methoden (bv. destillatie) niet mogelijk is.

2.2.1.6. Rendement.

Toegevoegde hoeveelheden ammoniak van 10 tot 100 mg N % werden voor 99,2 % ($s = 0,58$ %) teruggedoseerd.

2.2.1.7. Reproduceerbaarheid.

In het gebied van 20 tot 60 mg N % gaven de dubbelproeven een standaardafwijking van 0,4 mg, hetzij een variatiekoëfficiënt van 1,0 %. In het gebied 61 tot 150 mg bedroeg dit 1,1 mg, hetzij gemiddeld 1,2 %.

2.2.2. Ureum.

De methode van Conway (1962) werd aan de versnelde mikrodifusietechniek aangepast.

2.2.2.1. Reagens.

- Urease-oplossing : 500 mg urease (Merck, 250.000 E/g) worden met 100 ml fosfaatbuffer pH 7 ($3 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ in 100 ml water) gemengd. Men filtreert en verdunt 1 : 10 voor gebruik ; is ongeveer 4 weken in frigo houdbaar.

2.2.2.2. Uitvoering.

Men homogeniseert 10 g vis in 400 ml ammoniakvrij water en verdunt vervolgens 1 ml filtraat tot 50 ml. Men pipeteert hiervan 1 ml in een diffusieflesje en voegt 0,5 ml ureasefosfaatoplossing toe. Men laat de hydrolyse gedurende 15 min. bij kamertemperatuur doorgaan, voegt 1 ml verzadigde kaliumkarbonaatoplossing toe en voert verder de ammoniakbepaling zoals beschreven in 2.2.1.3. uit. Men bepaalt terzelfdertijd in een blanco-proef het oorspronkelijk ammoniakgehalte dat dan van het proefresultaat wordt afgetrokken vooraleer het ureumgehalte wordt berekend. De urease-oplossing zelf geeft

een extinktie van $E_{1\text{cm}} = 0,025$ ($s = 0,0002$).

De hydrolyseduur van 15 min verzekert een volledige omzetting van ureum en dient niet streng in acht te worden genomen.

2.2.2.3. Invloedsfactoren.

Kistiakowsky et al. (1952) wezen op het feit dat de gebruikte fosfaatbuffer door bepaalde aanwezige onzuiverheden op urease inhibitorisch kan werken. Dit is vooral het geval wanneer de urease-oplossing zeer verdund is. Voor de bepaling van de urease-aktiviteit verkiezen Gorin en Chin (1966) dan ook trisbuffer te gebruiken, die gemakkelijk in zeer zuivere vorm te verkrijgen is. Ook tegenover metaalionen is urease gevoelig, waardoor het toevoegen van EDTA aangeraden wordt (Shaw 1954).

Om dit te testen werden 20 vergelijkende proeven op visextrakten uitgevoerd waarbij respectievelijk de normale fosfaatbuffer, een tris-buffer (Gorin en Chin 1966) en een fosfaatbuffer waaraan 10^{-3}M EDTA werd toegevoegd, gebruikt werden. Alle extinktiefactoren waren begrepen tussen 0,200 en 0,300.

T.o.v. de fosfaatbuffer gaf de tris-buffer een gemiddeld positief verschil van $E = 0,002$ (spreidingsbreedte : $-0,017$ tot $+0,020$) en de EDTA-fosfaatbuffer $E = 0,005$ (spreidingsbreedte : $-0,022$ tot $+0,025$). Toepassing van de toets met gepaarde vergelijkingen liet geen significant verschil uitkomen.

Ook de reproduceerbaarheid van de individuele waarnemingen bleek niet wezenlijk te verschillen. Hiervoor werden de standaardafwijkingen uit de vier herhalingen van iedere bepaling berekend en bedroegen respectievelijk voor de fosfaatbuffer 0,006, voor de trisbuffer 0,008 en voor de EDTA-fosfaatbuffer 0,007.

De bovenvermelde werkwijze bleek aldus geschikt te zijn om ureum in doornhaai-extrakten te doseren. Zij werd dan ook verder in ongewijzigde vorm toegepast.

2.2.2.4. Rendement.

Toegevoegde hoeveelheden ureum van 500 tot 1.000 mg % werden voor 98,8 % ($s = 1,2$ %) terug bepaald.

2.2.2.5. Reproduceerbaarheid.

In het gebied van 600 tot 2.000 mg % gaven de dubbelproeven een standaardafwijking van 26 mg aan, overeenkomend met een variatie-coëfficiënt van 2,0 %.

2.2.3. Trimethylamine (TMA).

Men bepaalt TMA meestal hetzij met de kolorimetrische pikraat-metode van Dyer (1945), hetzij met de mikrodifusiemetode van Beatty en Gibbons (1936) volgens het Conway-principe.

Alhoewel de methode van Dyer zeer gevoelig en reproduceerbaar is, heeft zij enkele belangrijke nadelen : zij omvat veel bewerkingen en is zeer gevoelig voor water en organische onreinigheden (vet, detergens). Het minste spoor van deze stoffen kan aanzienlijk fouten geven.

De nadelen van de mikrodifusie-techniek volgens Conway werden in 2.2.1. aangehaald. Voor lage concentraties aan TMA kunnen grote afwijkingen optreden. Bij lange diffusieduur treedt daarbij dikwijls hydrolyse van trimethylamineoxyde op (Spinelli 1964).

Daar met de versnelde mikrodifusietechniek goede resultaten voor ammoniak werden geboekt, werd getracht deze methode aan de TMA dosering aan te passen.

Hiervoor diende echter een kleurreagens gevonden te worden dat gevoelig genoeg is en niet gestoord wordt door het water aanwezig in het zwavelzuur 1N waarin het TMA geabsorbeerd is. Daarenboven moest het relatief eenvoudig en rechtstreeks kunnen toegepast worden.

In de literatuur werden slechts enkele reagentia gevonden die eventueel aan deze vereisten zouden voldoen : de chloraniltest voor aminen (Sivadjian 1931), het Dragendorff-reagens (Bregoff et al. 1953), de reactie van kaliumpentacyanoferraat en kobaltnitriet (Jacobs en Hoffman 1931 ; Dyer 1945), het aminozuurreagens van Folin (natrium naftochinon-4-sulfonaat) (1922), het fenolreagens van Folin en Ciocalteu (1927) en de reactie met itaconinezuuranhydride (Wronski 1966).

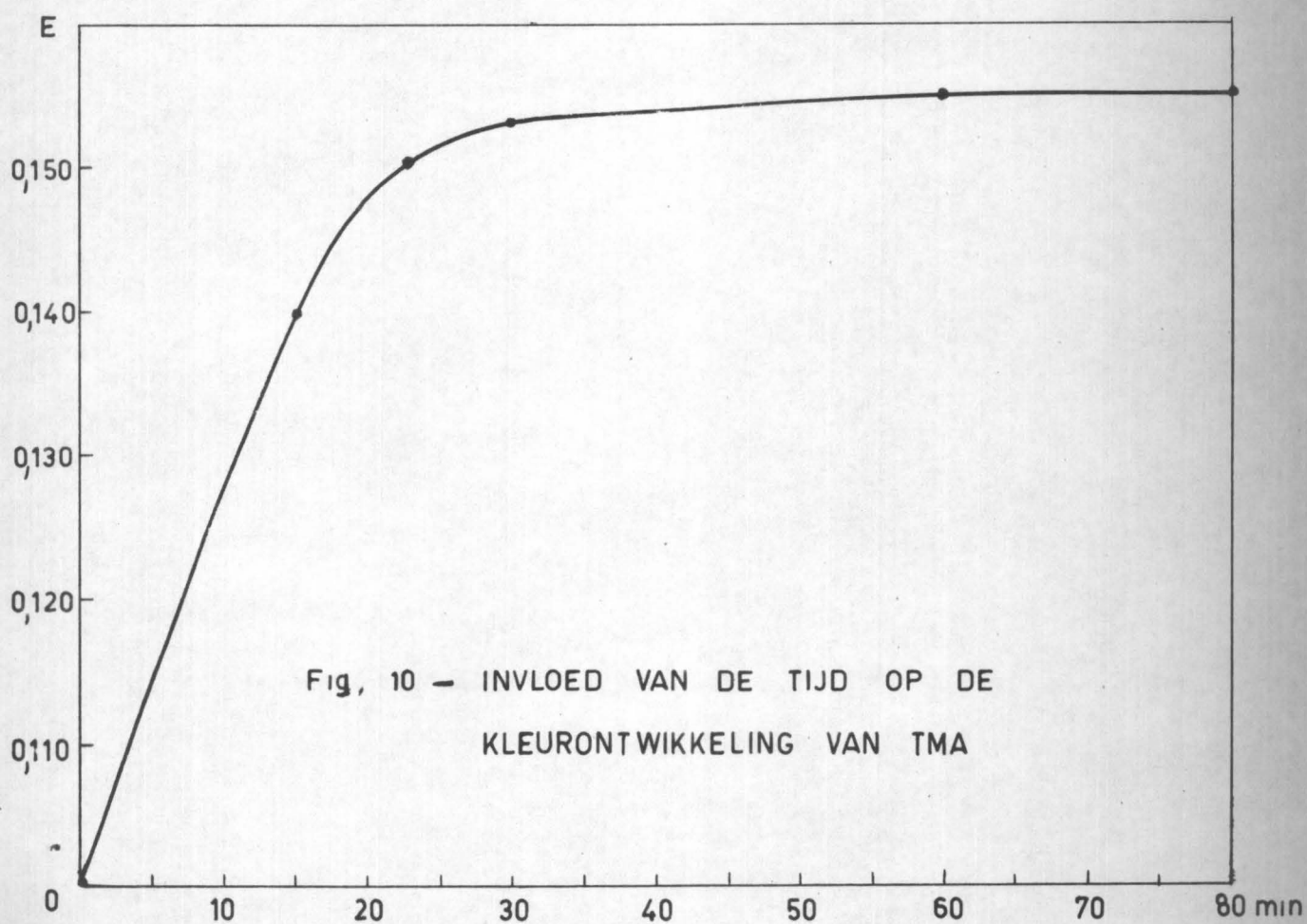
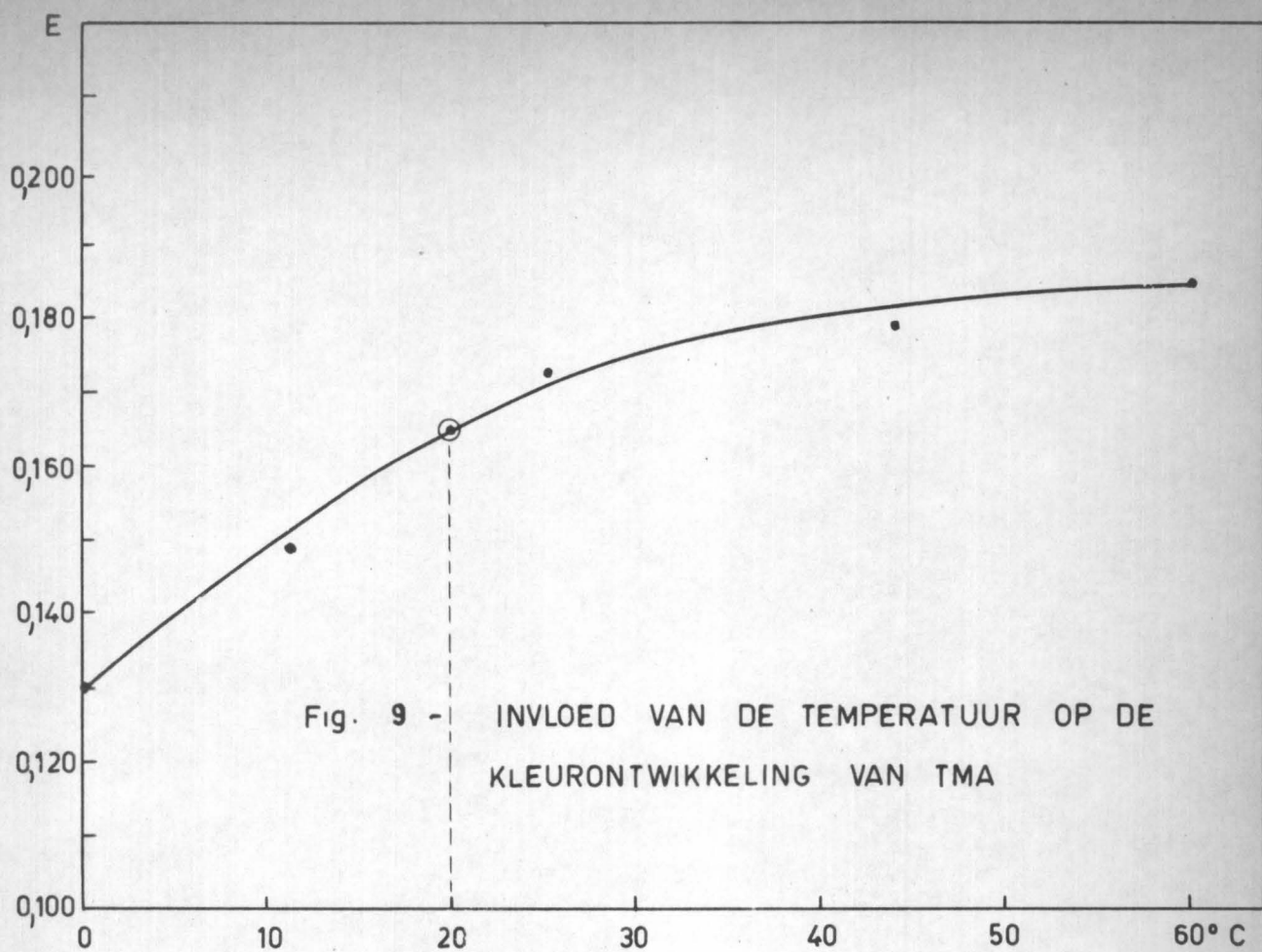
Deze reagentia werden in oriënterende proeven op hun bruikbaarheid onderzocht en enkel het fenolreagens van Folin en Ciocalteu bleek in aanmerking te kunnen komen. Het werd dan ook aan een verder onderzoek onderworpen, en bleek geschikt om TMA in vis te doseren.

2.2.3.1. Werkwijze.

Eén ml visextract wordt aan de versnelde mikrodiffusie onderworpen, zoals beschreven in 2.2.1.3.

Het uiteinde van de glazen staaf wordt echter gedompeld in 4 ml Na_2CO_3 2 % in 0,1 N NaOH ; 2 ml Folin-Ciocalteu-reagens (Merck, verdund 1 : 10 voor gebruik) worden vlug bijgepipeteerd. Om geen ontsnapping van TMA (alkalisch midden) te hebben worden deze bewerkingen in een proefbuisje met gerodeerde hals B24, waarin de staaf en de stop van de mikrodiffusiefles juist passen, uitgevoerd.

De buisjes worden gedurende 1 uur in een thermostatisch waterbad bij $20^\circ \text{C} \pm 0,1 \text{C}$ geplaatst en de extinktie wordt afgelezen bij 690 nm.



2.2.3.2. Invloedsfactoren.

- Invloed van het oplosmiddel.

De kleurontwikkeling dient in alkalisch midden te gebeuren. In het oorspronkelijk recept van Folin en Ciocalteu (1927) wordt 2 % Na_2CO_3 opgegeven. In hun modifikatie van de methode voor de bepaling van het eiwitgehalte met behulp van het fenolreagens geven Lowry et al. (1951) echter de voorkeur aan 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH, hetgeen de pH doet toenemen en de gevoeligheid van de reactie verhoogt. Beide oplosmiddelen werden beproefd. Hiervoor werden tien vergelijkende proeven met extincties van 0,050 tot 0,200 uitgevoerd. De oplossing van 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH (pH 10,59) gaf waarden die gemiddeld 34,1 % hoger lagen dan bij 2 % Na_2CO_3 (pH 9,52). De standaardafwijking bedroeg hierbij 1,8 %.

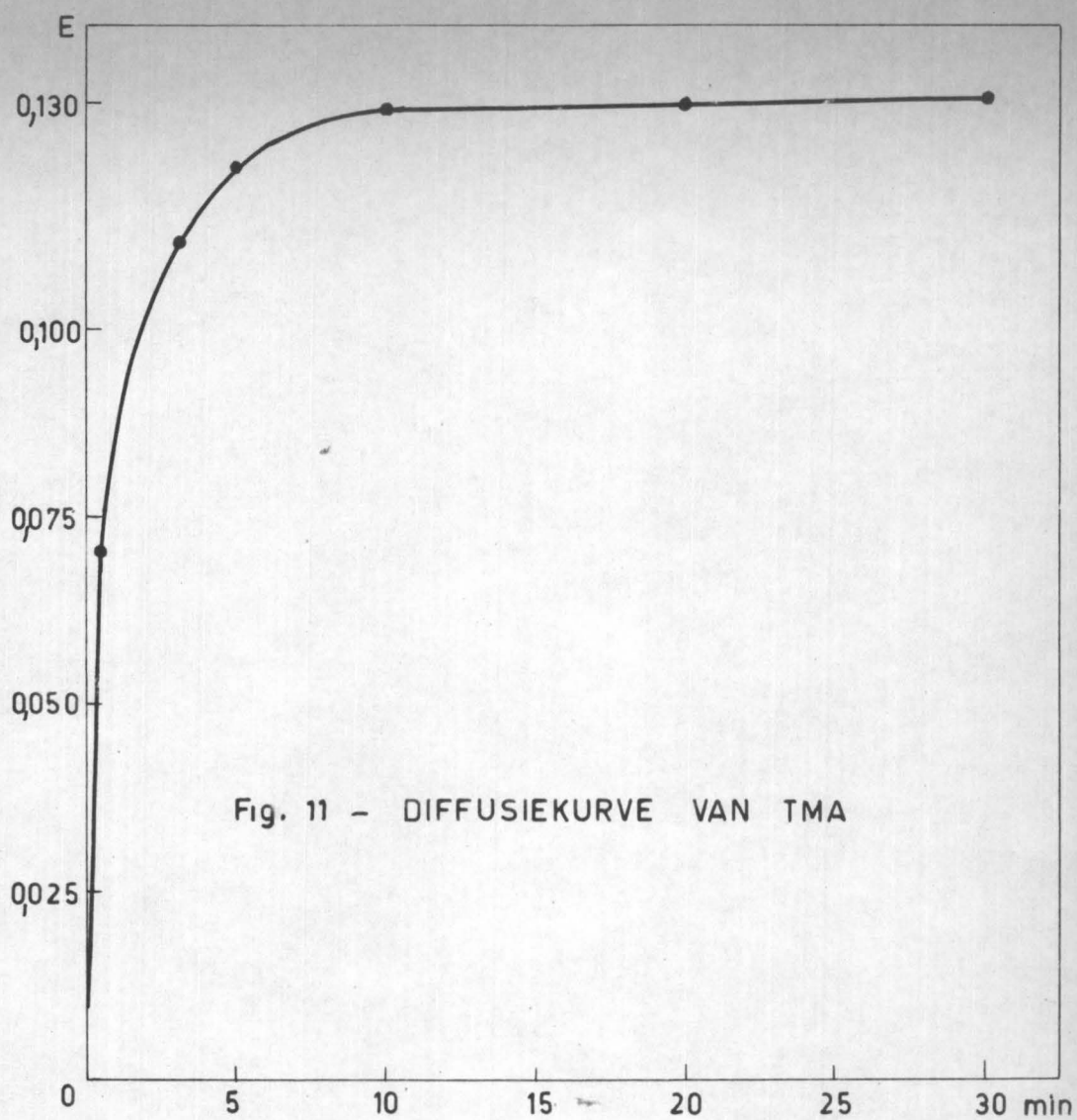
Lowry et al. (1951) stelden vast dat het toevoegen van Cu^{++} de kleurintensiteit van bepaalde aminozuren in het Folin-reagens verhoogt. Dit bleek voor TMA niet het geval te zijn. Ook bleek het overbodig een reaktieduur van 10 min vóór het toevoegen van het reagens in acht te nemen, zoals door bovenvernoemde auteurs vermeld.

- Invloed van de temperatuur.

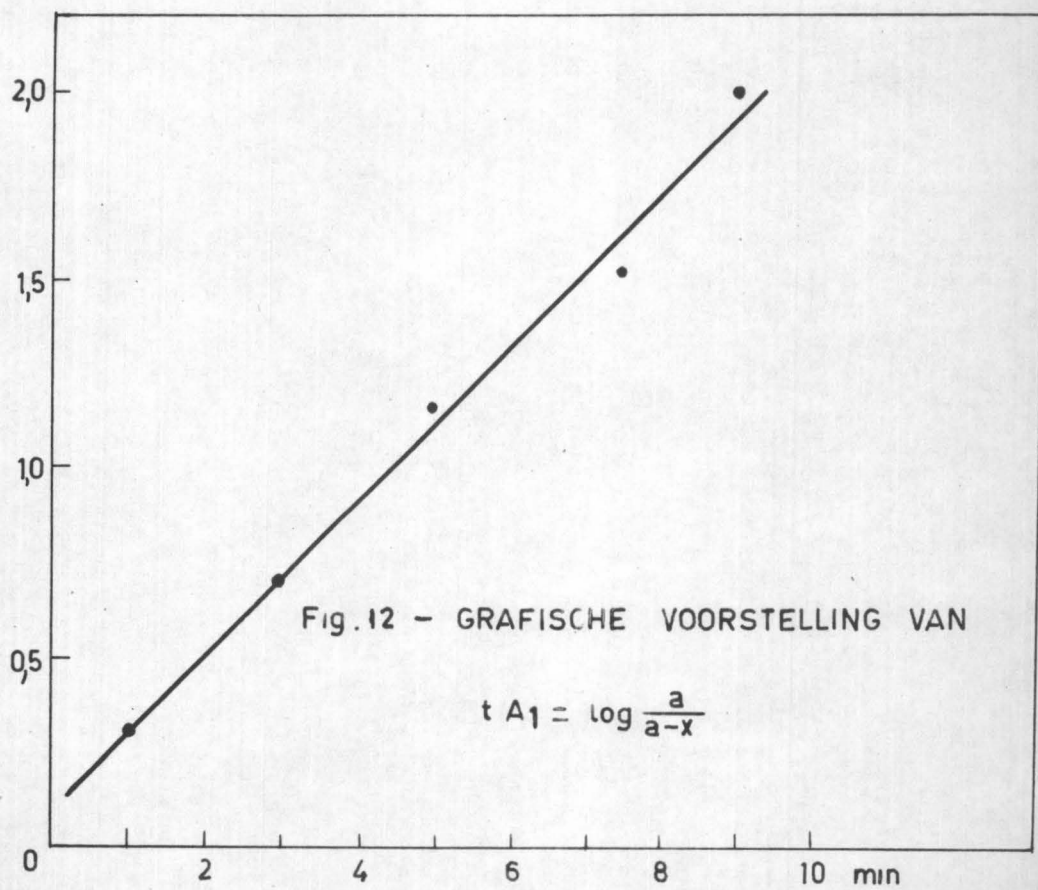
De temperatuur blijkt een grote invloed op de kleurontwikkeling uit te oefenen (figuur 9). De proeven werden tienmaal met $11 \mu\text{g}$ TMA-N uitgevoerd. De gemiddelde standaardafwijking bedroeg 0,0014 extinctie-eenheden. Om praktische redenen werd de bepaling bij 20° C uitgevoerd.

- Invloed van de reaktieduur.

De invloed van de reaktieduur werd getest in tien dubbelproeven met $10 \mu\text{g}$ TMA-N uitgevoerd. Uit de resultaten die grafisch



$\log \frac{a}{a-x}$



in figuur 10 zijn weergegeven ($s_{\text{gem.}} = 0,0015$), bleek dat na 30 min. 99,3 % van de maximale extinktie bereikt wordt. Het interval van vertrouwen voor de individuele waarnemingen bedroeg $\pm 1,6$ ($\alpha = 0,05$).

- Invloed van de diffusie.

Het was van belang na te gaan of de versnelde diffusie van TMA aan de algemene mikrodifusiewetten beantwoordt.

De gemiddelde diffusiekurve (5 proeven met $8,5 \mu\text{g N}$ uitgevoerd ; $s = 0,0013$ tot $0,0016$) is in figuur 11 weergegeven. Ook de basisfunctie $\log \frac{a}{a-x} = t \cdot A_1$ (Conway 1962) werd berekend. Hierbij is a de beginkoncentratie aan TMA, x de gediffundeerde hoeveelheid TMA, t de diffusieduur en A_1 de absorptiesnelheidskonstante. De functie werd tevens in figuur 12 uitgezet. Hieruit blijkt dat een rechte bekomen wordt met als vergelijking

$$\log \frac{a}{a-x} = 0,2045 t + 0,096$$

Het intercept 0,096 bleek met een waarschijnlijkheid van 99 % niet significant van 0 te verschillen. Men kan dan ook aannemen dat de diffusie van TMA volgens een reactie van de eerste orde verloopt en de vermelde basisfunctie volgt.

De gemiddelde absorptiesnelheidskonstante A_1 bedraagt 0,233 ($s_{\text{gem.}} = 0,0081$) en is aldus ongeveer 2,2 maal groter dan de konstante voor ammoniak (0,104). De tijd voor 99,5 % diffusie bedraagt

$$\log \frac{100}{0,5} / 0,233 = 10 \text{ min.}$$

De diffusieduur kan dus korter genomen worden dan voor ammoniak. Daar beide bepalingen echter meestal samen uitgevoerd werden, werd een tijd van 30 min genomen.

- Invloed van ammoniak en dimethylamine.

Proeven uitgevoerd met 20 μ g van iedere verbinding toonden aan dat de TMA-bepaling niet beïnvloed wordt. Wat betreft ammoniak betekent dit een nieuw voordeel t.o.v. de mikrodifusiemetode volgens Conway. Inderdaad, in deze laatste methode is het noodzakelijk het ammoniak met formaldehyde te binden.

2.2.3.3. Rendement.

Wanneer hoeveelheden TMA van 1 tot 10 mg N % aan het vis-extrakt werden toegevoegd werd gemiddeld 99,5 % (s = 0,71 %) teruggevonden.

2.2.3.4. Reproduceerbaarheid.

In het gebied 1 tot 10 mg N % gaven de dubbelproeven een standaardafwijking van 0,06 mg, hetzij een variatiecoëfficiënt van 1,25 %. Tussen 11 en 20 mg N % was dit 0,18 mg of 1,20 %.

2.2.4. Trimethylamineoxyde (TMAO).

In alle voorgestelde methoden wordt het TMAO eerst tot TMA omgezet, dat dan volgens de boven beschreven technieken wordt gedoseerd. Als reductiemiddel werden tin, tinchloride, Devarda's legering en titaanchloride beproefd. De moeilijkheid bestaat erin ook bij lage concentraties een volledige reductie te bekomen. Bystedt et al. (1959) toonden aan dat titaanchloride de beste resultaten geeft. Hun methode werd hier verder onderzocht en aan de versnelde mikrodifusietechniek aangepast.

2.2.4.1. Werkwijze.

25 g vis worden met 200 ml trichloorazijnzuur 5 % gedurende 2 min gehomogeniseerd. In een maatkolf van 100 ml wordt aan 5 ml

filtraat 1 ml TiCl_3 -oplossing 10 % toegevoegd. Na 1 uur wordt tot 100 ml verdund en het TMA-gehalte wordt op 1 ml bepaald zoals in 2.2.3.1. beschreven. In een blankoproef wordt het oorspronkelijk TMA-gehalte gedoseerd en afgetrokken van de TMAO-bepaling.

Voor het testen van de methode werd TMAO-HCl (BDH) gebruikt, waarvan het gehalte in oplossing door Kjeldahl-bepaling werd gedoseerd.

2.2.4.2. Invloedsfactoren.

- Hoeveelheid TiCl_3 .

Twintig proeven werden uitgevoerd met respectievelijk 50 en 500 μg TMAO-N waarbij telkens 0,5 ; 1 en 2 ml 10 % TiCl_3 -oplossing werden gebruikt. De reductietijd bedroeg 2 uur. Tussen 1 en 2 ml TiCl_3 bleek geen verschil voor te komen. De reductie was hierbij maximaal en bedroeg voor 50 μg N : 98,4 % ($s = 1,9$ %) en voor 500 μg N : 99,0 % ($s = 1,5$ %). Tussen de drie standaardafwijkingen bleek geen wezenlijk verschil te bestaan (Hartley-test). Toepassing van de variantie-analyse toonde tevens aan dat de kleine genoteerde afwijkingen (respectievelijk 1,6 en 1,0 %) niet significant van 0 verschilden en dus binnen de grenzen van de proeffouten vielen.

Een toevoeging van 0,5 ml TiCl_3 gaf slechts een reductie van 83,1 % ($s = 2,5$ %) en bleek dan ook onvoldoende te zijn.

- Reduktietijd.

Analoge proefnemingen met respectievelijk 30, 60 en 120 min reductietijd werden uitgevoerd. Tussen 60 en 120 min werd geen verschil waargenomen en was de reductie maximaal. De bekomen procentuele hoeveelheden TMA bedroegen 98,3 % ($s = 1,9$ %) voor 50 μg N en 98,8 %

($s = 1,5 \%$) voor $500 \mu\text{g}$, hetgeen overeenkomt met de vorige proeven.

Na 30 min was slechts $67,3 \%$ ($s = 2,9 \%$) gereduceerd.

Een reductie van 1 uur is dan ook noodzakelijk maar tevens voldoende hetgeen in tegenstelling met Bystedt et al. (1959) staat, die 2 uur als minimale reductietijd opgeven.

- Oxyderen van het overtollig TiCl_3 .

Wanneer de pikraatmethode toegepast wordt voor de TMA-bepaling is het noodzakelijk het overtollige TiCl_3 te reduceren m.a.w. te ontkleuren door toevoeging van enkele druppels kaliumnitraatoplossing en een tiental minuten te wachten. Bij de hier beschreven diffusiemethode is dit overbodig, hetgeen nog een voordeel voor deze methode betekent.

- Rechtstreekse reductie in de diffusiecel.

Er werd ook beproefd de reductie rechtstreeks in de diffusiecel uit te voeren. Hiervoor werd aan 1 ml TMAO-oplossing 1 druppel 10% TiCl_3 -oplossing toegevoegd. Na 1 uur werd de diffusie zoals in 2.2.3.1. beschreven uitgevoerd. De proef werd tienmaal met respectievelijk 5, 10 en $15 \mu\text{g}$ TMAO-N herhaald. De gemiddelde ijkcurve bleek weinig van de vroeger bepaalde TMA-kurve af te wijken. Deze methode was aldus in principe wel bruikbaar maar de reproduceerbaarheid lag veel lager : de uit de dubbelproeven berekende standaardafwijking bedroeg $0,52 \mu\text{g}$ t.o.v. $0,15 \mu\text{g}$ voor de methode met afzonderlijke reductie. Toepassing van de F-test gaf een significant verschil ($\alpha = 0,01$).

De onrechtstreekse methode is dan ook te verkiezen.

2.2.4.3. Rendement.

Hoeveelheden TMAO van 50 tot 100 mg N % aan het visextrakt toegevoegd werden gemiddeld voor 98,4 % ($s = 0,96$ %) terug bepaald.

2.2.4.4. Reproduceerbaarheid.

De dubbelproeven gaven in het gebied 80 tot 200 mg N % een standaardafwijking van 2,6 mg, hetzij een variatiekoëfficiënt van 1,9 %.

2.2.5. Methylamine.

Methylamine werd bepaald met de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeen-metode van Dubin (1960). Het wordt eerst door versnelde mikrodifusie gedurende 60 min afgezonderd en dan in het reagens opgelost in booraatbuffer overgebracht. Na 10 min inkubatie bij 65° C wordt een HCl-dioxaan oplossing toegevoegd en de extinktie bij 353 nm gemeten (een Beckman DU spektrofotometer werd gebruikt). De invloed van ammoniak was verwaarloosbaar. De standaardafwijking bedroeg 0,12 mg, in het gebied 0,5 tot 1,5 mg N, overeenkomend met een variatiekoëfficiënt van 12 %.

2.2.6. Dimethylamine.

Dimethylamine werd bepaald volgens de methode van Dowden (1938), gewijzigd door Dyer en Mounsey (1945). Bij een hoeveelheid visextrakt wordt een koper-ammoniak-reagens (ammoniumacetaat, koper-sulfaat, natriumhydroxyde en ammoniumhydroxyde) en een oplossing van koolstofdissulfide in benzeen toegevoegd. Met dimethylamine wordt geel koperdimethyldithiocarbamaat gevormd dat kolorimetrisch bepaald wordt.

2.2.7. Creatinine.

Voor de bepaling van creatinine in biologische stoffen wordt meestal de Jaffé-reaktie (reaktie met pikrinezuur in alkalisch midden)

toegepast. Een methode werd hier op punt gesteld om het creatininegehalte rechtstreeks op visextrakten te bepalen.

2.2.7.1. Werkwijze.

50 g vis worden met 200 ml 5 % trichloorazijnzuuroplossing gedurende 2 min gehomogeniseerd en 1 ml filtraat wordt in een maatkolf van 25 ml gepipeteerd. Men voegt 5 ml verzadigde pikrinezuuroplossing toe, 2 ml 10 % NaOH-oplossing en wacht twee minuten. Men lengt tot 25 ml aan en kolorimetreert bij 490 nm.

2.2.7.2. Invloedsfactoren.

- Hoeveelheid pikrinezuur.

Proeven met 0,5 %, 1 % en verzadigde pikrinezuuroplossingen wezen uit dat deze laatste concentratie de meest geschikte is. Met 1 %-oplossing worden weliswaar ongeveer dezelfde gemiddelden bekomen maar de reproduceerbaarheid ligt tweemaal lager ($s = 0,04$ t.o.v. $0,02$ mg in het gebied 0,5 tot 1 mg/ml).

Hallmann (1960) gebruikte als reagens een natriumpikraatoplossing in natriumhydroxyde. Dit reagens bleek echter blankowaarden te geven die aan relatief grote schommelingen onderhevig waren. Wanneer verzadigde pikrinezuuroplossing en 10 % NaOH afzonderlijk bereid en gebruikt werden, werd dit verschijnsel niet vastgesteld. Deze werkwijze is dan ook nauwkeuriger.

- Reaktieduur.

Met zuivere creatinine-oplossingen wordt reeds na ongeveer 2 min reaktieduur een maximale extinktie bekomen die tijdbestendig is. Met visextrakten echter stijgt deze laatste voortdurend door de omzetting van het aanwezige creatine tot creatinine. De kolorimetrische bepaling mag dan ook niet worden uitgesteld.

2.2.7.3. Storende bestanddelen.

De Jaffé-reaktie is niet volledig specifiek voor creatinine. Bepaalde stoffen zoals glucose, ribose, glucuronzuur, ascorbinezuur, enz. storen de reaktie, maar zijn weinig of niet in vis aanwezig.

Kontroleproeven op ureum, TMA, TMAO en aminozuren uitgevoerd gaven negatieve resultaten. De hier toegepaste rechtstreekse methode bleek dan ook verantwoord te zijn.

2.2.7.4. Rendement.

Toegevoegde hoeveelheden creatinine van 15 tot 50 mg % werden gemiddeld voor 97,6 % ($s = 1,7$ %) teruggedoseerd.

2.2.7.5. Reproduceerbaarheid.

Voor een concentratie van 15 tot 70 mg % werd uit de dubbelproeven een standaardafwijking van 0,88 mg bekomen overeenkomend met een variatiecoëfficiënt van 2,1 %.

2.2.8. Creatine.

Creatine werd eveneens rechtstreeks op visextrakten bepaald. Door waterafsplitsing gaat het in creatinine over.

2.2.8.1. Werkwijze.

10 ml visextrakt worden tienmaal verdund. Men pipeteert hiervan 1 ml in een maatkolf van 25 ml en voegt 3 ml 1 N zwavelzuur toe. Men verhit bij 110° C gedurende 5 uur. Het creatininegehalte wordt bepaald zoals in 2.2.7.1. Het in een afzonderlijke proef bepaalde oorspronkelijke creatininegehalte wordt afgetrokken.

2.2.8.2. Invloedsfactoren.

- Gebruikte zuur.

Hughes (1960) stelde voor de waterafplitsing rechtstreeks met het pikrinezuurreagens uit te voeren. Deze werkwijze bleek echter weinig reproduceerbare resultaten te geven : in het gebied 0,5 tot 1,5 mg/ml bedroeg de standaardafwijking 0,12 mg t.o.v. 0,02 mg voor zwavelzuur.

Met 3 ml H_2SO_4 1 N wordt in 5 uur 99,6 % van het creatine omgezet ($s = 1,9 \%$). Met 1,5 ml bedraagt dit slechts 90,4 % ($s = 1,8 \%$).

- Reaktieduur.

Na 3 uur was 94,7 % ($s = 5,2 \%$) en na 5 uur - zoals vermeld - 99,6 % ($s = 1,9 \%$) creatine omgezet. De reproduceerbaarheid ($n = 20$) bleek significant te verschillen (F-test, $\alpha = 0,01$). Om deze reden is het beter een hydrolyseduur van 5 uur te nemen.

2.2.8.3. Rendement.

Bij het toevoegen van hoeveelheden creatine van 100 tot 300 mg % werd gemiddeld 97,0 % ($s = 2,1 \%$) teruggevonden.

2.2.8.4. Reproduceerbaarheid.

In het gebied van 150 tot 550 mg % gaven de dubbelproeven een standaardafwijking van 7,7 mg overeenkomend met een variatiekoëfficiënt van 2,2 %.

2.2.9. α -aminostikstof.

2.2.9.1. Werkwijze.

Voor de bepaling van de α -aminostikstof werd na oriënterende

proeven, waarbij de gasometrische methode van Van Slyke (1911) de formoltitratie en de ninhydrinemethode van Berger (1959) beproefd werden, de voorkeur aan de kopermethode van Pope en Stevens (1939) gegeven. De reden hiervoor is dat deze methode eenvoudiger uit te voeren is, geen reactie geeft met ureum en ammoniak, die in de meeste andere methoden storen, en anderzijds wel reageert met proline en hydroxyproline, die in doornhaai in relatief hoge concentraties blijken voor te komen en die bv. met de klassieke methode van Van Slyke niet bepaald worden.

De methode van Pope en Stevens is gebaseerd op het feit dat wanneer een suspensie van koperfosfaat aan een aminozurenoplossing wordt toegevoegd, deze laatste met Cu^{++} oplosbare verbindingen vormen. Een koperdosering geeft aldus het α -aminogehalte. Pope en Stevens voerden deze laatste bepaling jodometrisch uit. Wij hebben echter de voorkeur gegeven aan de kolorimetrische bepaling met diethyldithiocarbamaat ; de werkwijze van Charlot (1961) werd hierbij als basis genomen.

Voor de proef worden 20 g vis met 200 ml 5 % trichloorazijnzuuroplossing gedurende 2 min gehomogeniseerd ; 3 à 10 ml filtraat worden hiervan gebruikt. In enkele gevallen werd ook de extractie met 80 % alcohol (zie 2.2.11.1.) toegepast. Tussen beide methoden bleek geen significant verschil voor te komen.

2.2.9.2. Invloedsfactoren.

- Weinig oplosbare Cu^{++} -aminozuur-komplexen.

Sommige aminozuren (bv. cysteïne, methionine, tryptofaan, leucine, fenylalanine) vormen slechts weinig oplosbare kopercomplexen. Wanneer ze echter met andere aminozuren gemengd worden, worden ze wel oplosbaar (Pope en Stevens 1939). Twintig vergelijkende proeven

werden uitgevoerd om na te gaan of het noodzakelijk is een zekere hoeveelheid "oplosbaar" aminozuur toe te voegen. Hiervoor werden telkens aan één proef bij 5 ml visextract (trichloorazijnzuur) 1,60 mg glycine (= 0,3 mg N) toegevoegd. De andere proef werd normaal uitgevoerd.

Alle extinkties waren tussen 0,100 en 0,400 begrepen. De extinkties van de controleproeven werden van de test met toegevoegd glycine afgetrokken. De toets met de gepaarde vergelijkingen toonde aan dat het gemiddeld positief verschil van 0,004 (spreidingsbreedte : - 0,007 tot + 0,013) ten voordele van de glycine-test met een waarschijnlijkheid van 99 % niet significant was.

Men kan dan ook besluiten dat in de gebruikte visextracten voldoende "oplosbare" aminozuren aanwezig zijn en dat het toevoegen van glycine of een ander aminozuur overbodig is.

- Storende bestanddelen.

Ureum, TMAO en TMA bleken de bepaling niet te beïnvloeden. Volgens Clayton en Steele (1967) zou ammoniak (in urine) storen. Dit werd getest met de concentraties die normaal in het visextract aanwezig zijn en gaf een negatief resultaat.

2.2.9.3. Rendement.

Wanneer 10 à 50 mg N % glycine, α -alanine, leucine, phenylalanine, threonine, tyrosine, asparaginezuur, arginine en valine aan het visextract werden toegevoegd, werd gemiddeld 93,2 à 106,3 % teruggevonden (algemeen gemiddelde 96,4 %). De standaardafwijkingen liepen hierbij van 2,4 tot 5,1 %.

2.2.9.4. Reproduceerbaarheid.

De dubbelproeven gaven een standaardafwijking van 1,6 mg in het gebied 20 tot 120 mg N %. Dit komt overeen met een variatiekoëfficiënt van 2,3 %.

2.2.10. Peptiden.

2.2.10.1. Werkwijze.

Voor de dosering van het peptidengehalte werden 3 ml van het trichloorazijnzuur extract (zie 2.2.8.1.) in een ampulle van 10 ml gepipeteerd. Na toevoegen van 3 ml gekoncentreerd HCl werd deze toegesmolten en werd de oplossing gedurende 21 tot 24 u bij $110^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehydrolyseerd. Het α -amino-gehalte werd dan volgens 2.2.8.1. bepaald. Het oorspronkelijk aanwezig vrij aminozurenghalte werd afgetrokken.

2.2.10.2. Invloedsfactoren.

- Hydrolysemetode.

Voor de hydrolyse kon tussen de refluxmethode en de werkwijze met toegesmolten hydrolysebuis worden gekozen. Tien vergelijkende proeven met oplossingen tussen 50 en 60 mg N worden uitgevoerd met de boven beschreven methode enerzijds, met reflux onder stikstofstroom, anderzijds. Het gemiddeld verschil bedroeg + 2,4 mg (spreidingsbreedte - 2,1 tot + 6,3 mg) ten voordele van de reflux-methode, maar was met 99 % waarschijnlijkheid niet significant. Daar deze methode daarenboven omslachtiger is, werd de voorkeur aan de werkwijze met toegesmolten ampullen gegeven.

- Hydrolyseduur.

Bepalingen uitgevoerd na respectievelijk 12, 15, 18, 21 en

24 u toonden aan dat na 21 u geen verhoging van het α -amino-gehalte meer plaats greep.

2.2.10.3. Reproduceerbaarheid.

Tussen 5 en 70 mg N % gaven de dubbelproeven een standaard-afwijking van 1,6 mg, hetzij een variatiekoëfficiënt van 4,3 %.

2.2.11. Vrije aminozuren.

De scheiding van de vrije aminozuren werd met bidimensionele dunnelaagchromatografie uitgevoerd. De kwantitatieve bepaling geschiedde door rechtstreeks densitometrie en automatische registratie en integratie van de bekomen pieken. Cysteïne, cystine, proline en hydroxyproline werden evenwel met andere methoden gedoseerd.

2.2.11.1. Extraktie van de vrije aminozuren.

De methode van Awapara (1948) werd aangepast. Men homogeniseert 7,42 g vis (met een gemiddeld droge stofgehalte van 24 %) met 25 ml absolute ethanol gedurende 1 min. Men voegt driemaal 50 ml 80 % ethanol toe (telkens 1 min homogeniseren). Na filtratie worden 25 ml in een maatkolf van 100 ml gepipeteerd, die met chloroform wordt aangevuld. Er scheidt zich vrij vlug een waterige laag af (\pm 5 ml) die de vrije aminozuren bevat en vrij is van lipiden en de meeste koolhydraten en zouten.

Voor papierchromatografie moet het extrakt dan hetzij door lyophilisatie, hetzij door vakuümdistillatie worden gekoncentreerd (Hughes 1959 ; Jones 1959 ; Ranke 1960). Dit bleek echter met de hier toegepaste werkwijze overbodig te zijn (zie verder).

Er werd echter nagegaan of door verwarmen van de alcohol een hoger rendement bekomen werd. Proeven met alcohol die op 50° C werd

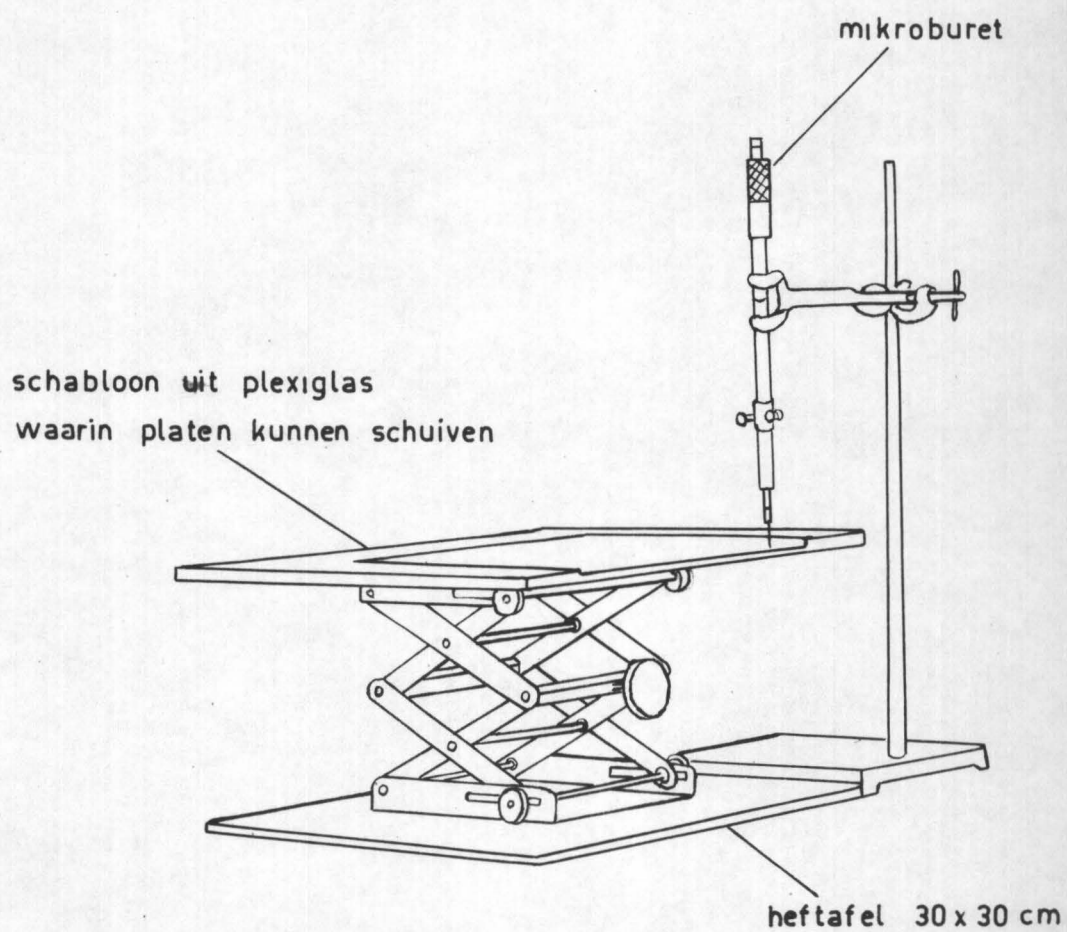


Fig.13 – Inrichting voor het aanbrengen van het te scheiden mengsel op dunnelaagchromatogrammen

verwarmd en waarbij het homogenaat vóór filtreren gedurende 60 min bij 50° C gehouden werd gaven echter geen significante verschillen. Het toevoegen van diverse aminozuren bleek een rendement van gemiddeld 94,3 % (s = 2,4 %) te geven, wanneer de α -aminostikstof bepaald werd volgens de methode beschreven in 2.2.8.1.

Men neemt algemeen aan dat hoge concentraties aan ureum de chromatografie storen (Block et al. 1958 ; Pataki 1966 ; Stahl 1967). Tijdens onze proeven bleek dit echter niet het geval te zijn. Integendeel, het toevoegen van een spoor urease om ureum te ontbinden, zoals door bovenvermelde auteurs wordt voorgesteld, bleek de reproduceerbaarheid van de R_f -waarden ongunstig te beïnvloeden en meer diffuse vlekken te veroorzaken.

2.2.11.2. Dunnelaagchromatografie van de aminozuren.

- Platen.

Celluloseplaten van 20 x 20 cm Schleicher & Schüll (nr. 1.440) werden gebruikt, daar zij een hogere reproduceerbaarheid dan zelf bereide platen bleken te bezitten, hetgeen voor kwantitatieve bepalingen belangrijk is.

- Aanbrengen van het te scheiden mengsel.

De aminozurenoplossing werd in frakties van 1 μ l op de plaat gespot. Telkens werd de vlek met een warme luchtstroom gedroogd. Ten einde de opeenvolgende vlekken op precies dezelfde plaats aan te brengen werd gebruik gemaakt van een heftafel van 30 x 30 cm voorzien van een schabloon uit plexiglas waarin de platen konden worden geschoven (figuur 13). De plaat werd dan telkens tot juist tegen de druppel van 1 μ l onderaan een precisie-doseerspuit met micrometerschroef Agla (Burroughes Wellcome Co., Londen), gebracht en dan onmiddellijk iets terug naar beneden gedraaid. Meestal werd 10 μ l

gespot. Wanneer echter van bepaalde aminozuren te sterke concentraties voorkwamen werden kleinere hoeveelheden genomen.

- Ontwikkeling.

Voor de bidimensionele ontwikkeling werden de diverse loopmiddelen door Pataki (1966) vermeld, beproefd. Verder werden eveneens volgende combinaties uitgetest : Butanol-azijnzuur-water (4 : 1 : 5)/Pyridine-amylalkohol-water (7 : 6 : 6) (Hörhammer et al. 1963), Butanol-azijnzuur-water (4 : 1 : 1)/Methanol-diethylamine 33 % (8 : 2) (Blanc et al. 1965) en Methanol-chloroform- 25 % ammoniak (2 : 2 : 1)/Methanol-water-pyridine (20 : 5 : 1) (Bondivenne en Busch 1967). Ook de multidimensionele techniek (vier loopmiddelen) van Von Arx en Neher (1963) met onverzadigde kamers werd beproefd.

Daar echter geen enkel loopmiddel volledige bevrediging bleek te geven werd naar andere solventsystemen gezocht. Voor de scheiding van de in doornhaai aanwezige vrije aminozuren bleken twee combinaties noodzakelijk te zijn.

De meeste zuren konden door het systeem methanol-butanol -- 17 % ammoniak (80 : 20 : 20)/fenol-water (75 : 25 + 25 mg NaCN) worden gescheiden. Hydroxyproline en proline (gele vlekken) overlaptten gedeeltelijk respectievelijk β -alanine en methionine maar de interferentie was verwaarloosbaar daar de iminozuren bij 525 nm praktisch geen extinktie vertonen. Voor de bepaling van lysine, ornithine, asparaginezuur en glutaminezuur werd dezelfde combinatie gebruikt ; in de ontwikkelkamer werd echter tijdens de tweede ontwikkeling een bekertje sterke ammoniak geplaatst.

De ontwikkeling werd volgens de voorschriften van Stahl (1967) in glazen kamers, volledig belegd met filtreerpapier om een oververzadigde atmosfeer te verwezenlijken, doorgevoerd. Per kamer

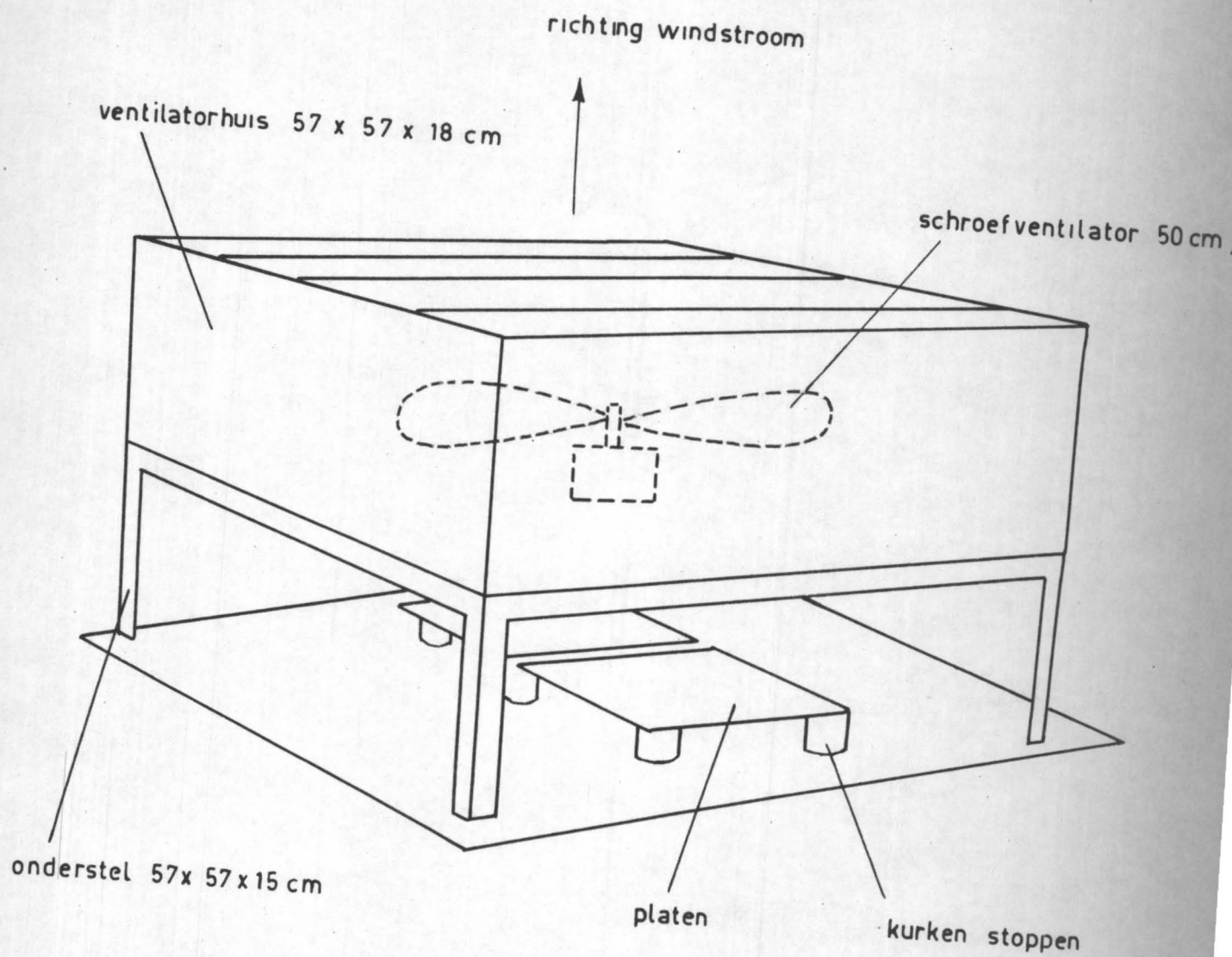


Fig.14 - Drooginrichting voor dunnelaagchromatogrammen

werden twee platen in loodrechte stand ontwikkeld. Als loopafstand werd 11 tot 12 cm genomen. De looptijden bedroegen hierbij respectievelijk gemiddeld 2 u, 4u30 en 4u30 voor methanol- butanol- ammoniak, fenol-water en fenol-water + ammoniak.

Alle proeven werden in vierdubbel uitgevoerd. De gemiddelde R_f -waarden voor de drie systemen zijn in tabel 2 vermeld. Zij bleken goed reproduceerbaar te zijn : de gemiddelde variatiecoëfficiënt bedroeg 3,6 %. Op te merken valt dat met het loopmiddel fenol-water en ammoniak in de gasfaze voor de basische aminozuren (histidine uitgezonderd) l-methylhistidine, anserine en carnosine, duidelijk hogere R_f -waarden bekomen werden. Dit verschijnsel is in de papierchromatografie eveneens bekend (Block et al. 1958).

Bij bidimensionele - en daarenboven kwantitatieve - dunne-laagchromatografie moeten de werkomstandigheden strikt gelijk genomen worden. Na de eerste ontwikkeling werden de platen gedurende juist 20 min bij kamertemperatuur met behulp van een hiervoor gebouwde eenvoudige ventilatorinstallatie gedroogd (figuur 14). Uit vergelijkende proeven bleek het drogen bij hogere temperatuur (60° C) geen voordelen te bieden.

Na de tweede ontwikkeling werden de platen gedurende 45 min in een geventileerde droogstoof bij 60° C ($\pm 0,5^\circ$ C) gedroogd.

Tabel 2 - Gemiddelde R_f -waarden van de aminozuren ($\times 100$).

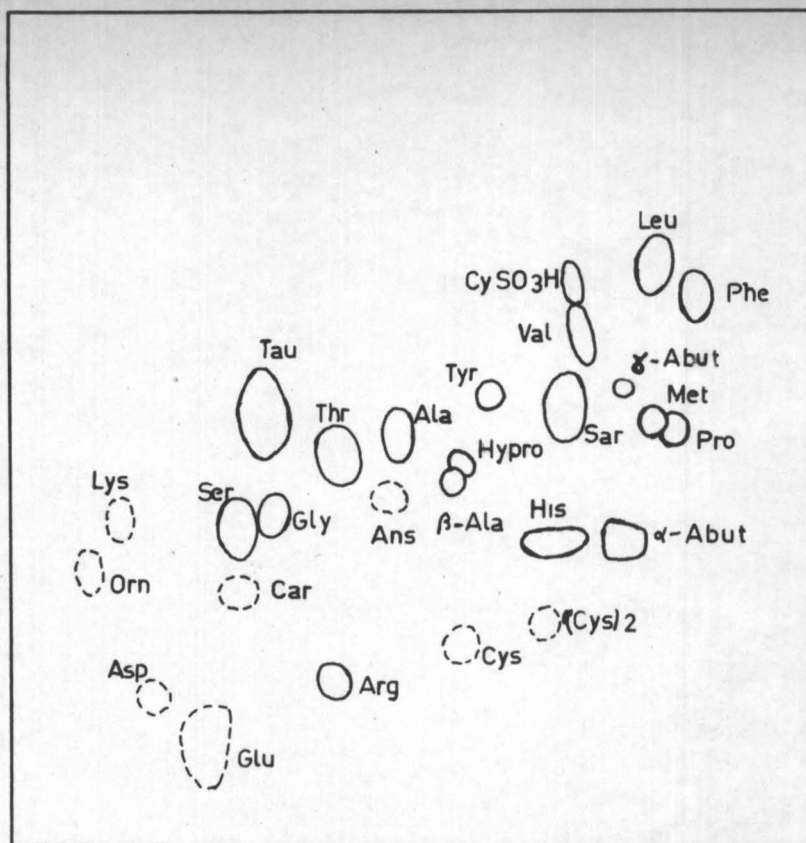
Aminozuren	Loopmiddelen (⌘)		
	1	2	3
α -alanine	48	46	55
β -alanine	49	54	56
α -aminoboterzuur	36	59	65
γ -aminoboterzuur	54	72	71
arginine	20	39	85
asparaginezuur	18	15	10
cysteïne	23	55	37
cystine	26	66	42
fenylalanine	72	88	77
glutaminezuur	70	24	16
glycine	41	30	36
histidine	34	72	63
hydroxyproline	47	56	55
leucine	70	83	75
lysine	40	12	78
methionine	51	75	80
l-methylhistidine	44	40	91
ornithine	32	11	72
proline	50	82	84
sarcosine	55	67	67
serine	38	25	30
taurine	50	27	34
threonine	45	40	42
tyrosine	54	55	60
valine	66	72	68
anserine	44	45	96
carnosine	34	28	85

(⌘) 1 : methanol-butanol - 17 % ammoniak (80 : 20 : 20)

2 : fenol-water (75 : 25)

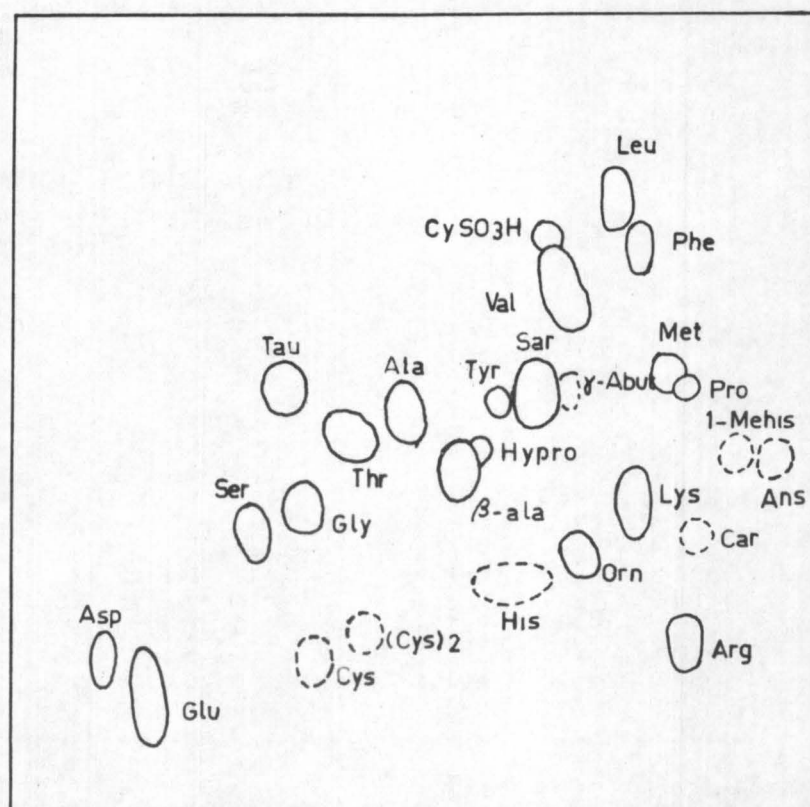
3 : fenol-water (+ ammoniak in gasfaze) (75 : 25)

METHANOL - BUTANOL - 17% AMMONIAK (80 : 20 : 20)



FENOL - WATER (75 : 25)

METHANOL - BUTANOL - 17% AMMONIAK (80 : 20 : 20)



FENOL - WATER (+AMMONIAK) (75 : 25)

Fig. 15 - Chromatogrammen van aminozuren met twee loopmiddelen kombinaties (○ : onduidelijke vlek)

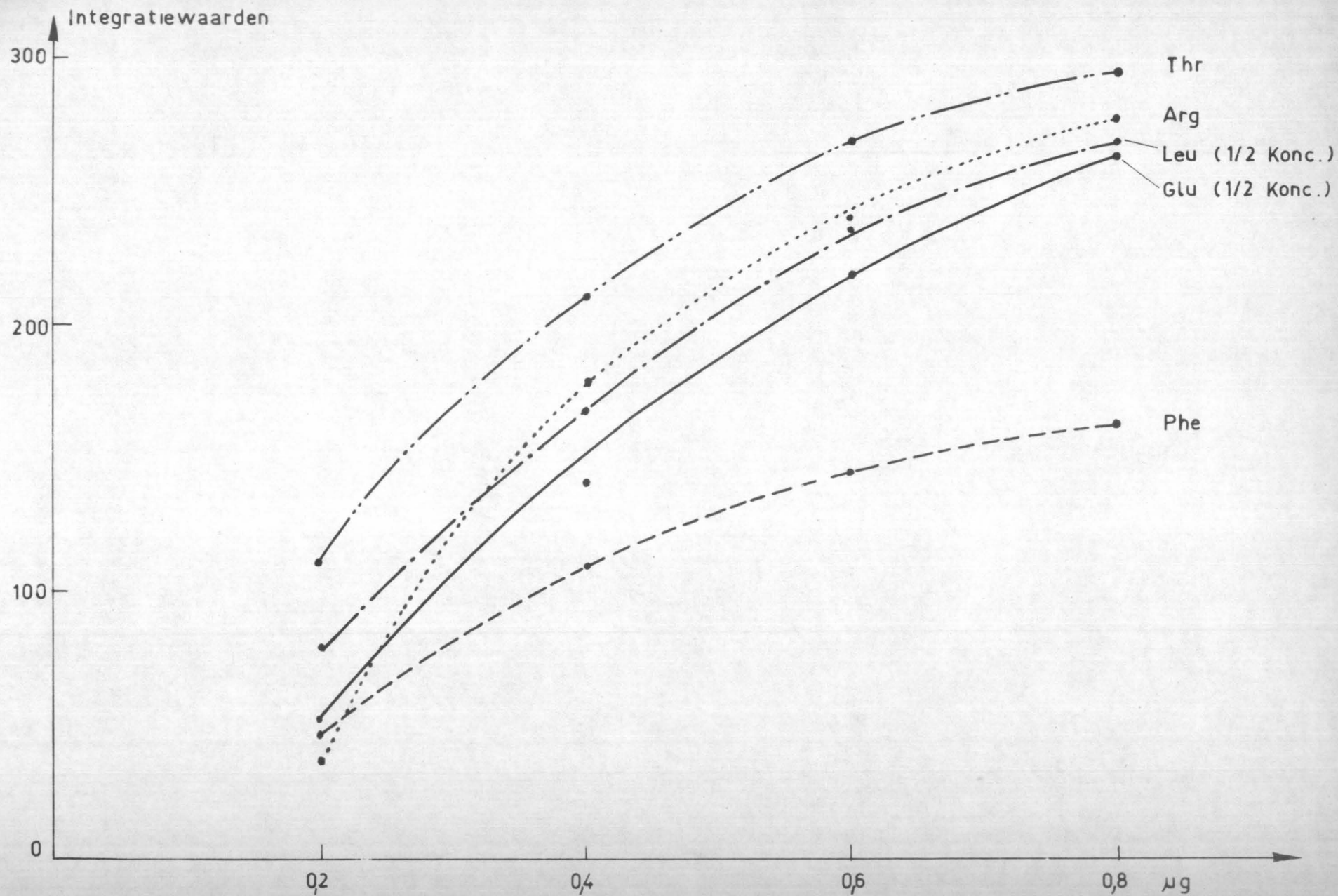


Fig. 16 -- Densitometrische ijkcurven van enkele aminozuren

- Revelatie.

Na 5 min werden de platen met 0,1 % ninhydrine in isopropanol dat 2,5 % collidine bevat (aerosol Merck) besproeid. Zij werden dan 30 min bij 60° C verwarmd. Figuur 15 geeft het vlekkenpatroon in werkelijke grootte van de aminozuren weer, respectievelijk met loopmiddelenkombinaties 1-2 en 1-3.

De platen werden dan in het donker bij 10° C tot 's anderdaags bewaard. Deze temperatuur bleek meer reproduceerbare resultaten dan de kamertemperatuur te geven. De enkele aminozuren met fenolwater + ammoniak ontwikkeld, werden echter onmiddellijk gedoseerd daarna enkele uren witte vlekken op de plaat verschenen.

Tijdens de oriënterende proeven, en telkens er twijfel bestond, werden ter identificering ook verschillende specifieke sproeimiddelen gebruikt, nl. het Sakaguchi-, Pauly-, Ehrlich-, isatine-, Dragendorff- en vanilline-reagens, bereid volgens Stahl (1967).

2.2.11.3. Densitometrie.

De platen werden densitometrisch geanalyseerd met de automatische uitrusting Photovolt TLC 530 voorzien van een registreerapparaat Varicord 42 en een automatische integrator Integrator 49 (Photovolt Corp., New York) ; een kollimatisch diafragma van 0,1 x 15 mm en een filter van 525 nm bleken optimale resultaten te geven.

De ijkcurven werden met concentraties van 0,1 tot 1 µg opgesteld.

Ter illustratie werden in figuur 16 de kurven van een neutraal (leucine), basisch (arginine), zuur (glutaminezuur), aromatisch (fenyl-alanine) aminozuur, alsmede van een aminozuur met OH-functie (threonine) weergegeven. Daar de kurven met stijgende kon-

concentratie een vlakker verloop kennen heeft men er belang bij het aminozuurgehalte relatief laag te houden. Hiermede worden trouwens sommige vlekken beter gescheiden.

Tussen 30 min en 20 u bleek de kleurintensiteit met 1 tot 10 % te verhogen.

2.2.11.4. Reproduceerbaarheid.

Uit de proeven die in vierdubbel werden uitgevoerd bleek dat in het gebied 0,1 tot 0,5 μ g, waarin meestal werd gewerkt, de standaardafwijking voor de diverse aminozuren van 0,012 tot 0,066 μ g schommelde (tabel 3) hetgeen overeenkomt met een variatiecoëfficiënt van 4 tot 22 %.

De reproduceerbaarheid van de methode schommelt dan ook volgens het aminozuur en de concentratie tussen ± 8 tot ± 44 % (individuele waarden, $\alpha = 0,05$).

Tabel 3 - Standaardafwijkingen (in μg) en variatiecoëfficiënten (%) van de aminozuren (⌘).

	s	v
α -alanine	0,021	7
β -alanine	0,013	10
arginine	0,042	14
asparaginezuur	0,043	14
fenylalanine	0,018	6
glutaminezuur	0,050	17
glycine	0,058	19
histidine	0,066	22
leucine	0,013	4
lysine	0,047	16
methionine	0,067	22
ornithine	0,057	19
sarcosine	0,040	13
serine	0,050	17
taurine	0,014	10
threonine	0,032	11
tyrosine	0,042	14
valine	0,013	4

(⌘) Voor lysine, ornithine, glutaminezuur en asparaginezuur :
loopmiddelen 1 en 3 ; andere aminozuren : 1 en 2.

2.2.12. Cysteïne en cystine.

2.2.12.1. Werkwijze.

De methode van Fernandez en Henry (1965) werd gebruikt. Hierbij geeft cysteïne met 2,6-dichloro-p-benzochinon een rode kleur met maximale extinctie bij 510 nm. Het reagens is specifiek voor de structuur $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SH}$ (cysteamine) en is onafhankelijk van

de aanwezigheid van vrije of geësterificeerde groepen (cysteïne, methylcysteïne). De gevoeligheid van de methode blijkt zesmaal groter te zijn dan deze van de klassieke methode van Sullivan met Folin- reagens (1,2-naftochinon-4-sulfonaat).

Cysteïne wordt rechtstreeks bepaald. Cystine wordt eerst door koper-I-chloride gereduceerd en als cysteïne-koper-I-merkaptide neergeslagen ; dit wordt dan door het doorleiden van waterstofsulfide ontbonden en het vrijgestelde cysteïne bepaald. Het oorspronkelijk cysteïne-gehalte wordt afgetrokken.

Fernandez en Henry, die de methode voor urine op punt stelden, konden vrij cysteïne alleen niet bepalen, daar de ontwikkeling van het chromogeen in sterk zwavelzuurmidden dient te geschieden en hierdoor een donkere kleur in de urine ontstaat. Voor trichloorazijnzuur-extrakten van doornhaai bleek dit echter het geval niet te zijn zodat beide aminozuren konden worden gedoseerd.

2.2.12.2. Storende factoren.

TMAO, TMA, ureum, ammoniak en aminozuren bleken geen invloed op de bepaling te hebben.

2.2.12.3. Rendement.

Wanneer tienmaal een hoeveelheid cysteïne van 5 tot 15 mg % toegevoegd werd, werd gemiddeld 98,3 % ($s = 2,1$ %) teruggevonden. Voor cystine bedroeg dit voor dezelfde hoeveelheden 96,4 % ($s = 3,5$ %).

2.2.12.4. Reproduceerbaarheid.

Voor cysteïne werd in het gebied 7 tot 23 mg % een standaard-afwijking van 0,39 mg gevonden hetzij een variatiecoëfficiënt van 2,6 %.

Voor cystine bedroegen deze cijfers tussen 8 en 16 mg % respectievelijk 0,44 mg en 3,7 %.

2.2.13. Proline.

2.2.13.1. Werkwijze.

De methode van Troll en Lindsley (1955) werd toegepast. Hierbij wordt ninhydrine in sterk zuur midden gebruikt ; met proline en de basische aminozuren wordt een relatief stabiel rood complex bekomen. De basische aminozuren worden vóór de proline-bepaling met een zwak zure ionenwisselaar (Zeokarb 226, H^+ -vorm) verwijderd. Daar dit in neutraal midden dient te gebeuren, omdat anders proline-verliezen optreden, werd een alcohol-chloroformextract i.p.v. een trichloorazijnzuurextract gebruikt (zie 2.2.11.1.).

Cysteïne stoort echter in de methode van Troll en Lindsley. Er werd beproefd dit te vermijden door een permierenzuur-oxydatie uit te voeren, waardoor cysteïne en cystine in cysteïnezuur omgezet worden, dat de kolorimetrische prolinebepaling niet stoort. (Wren en Wiggall 1965). Deze werkwijze bleek echter zeer omslachtig te zijn en verminderde daarenboven de reproduceerbaarheid : de variatiecoëfficiënt steeg van 3,7 tot 6,2 % (dubbelproeven). Daar cysteïne echter met ninhydrine in sterk zuur midden goed reproduceerbare extinktiewaarden geeft (in 1967 stelde Gaitonde zelfs een methode voor de bepaling van cysteïne volgens hetzelfde principe voor) werd verkozen een korrektiefactor hiervoor in te voeren : de equivalente extinktiewaarde overeenkomend met het gehalte aan cysteïne bepaald volgens de in 2.2.12.1. beschreven methode werd van de proline-waarden afgetrokken.

2.2.13.2. Storende bestanddelen.

Volgens Messer (1961) zouden diverse aminozuren, dipeptiden en tripeptiden storen en zou het toevoegen van glycine dit beletten.

Uit de vergelijkende proeven werd een gemiddeld positief verschil van 3,4 mg % (spreidingsbreedte - 1,5 à 4,9 mg) ten voordele van glycine bekomen. Dit verschil was echter met 99 % waarschijnlijkheid niet significant. Tyrosine en hydroxyproline die volgens Wren en Wiggall (1965) eveneens kunnen storen, bleken in de concentraties die in doornhaai voorkomen een verwaarloosbaar kleine invloed te hebben.

2.2.13.3. Rendement.

Wanneer hoeveelheden van 20 tot 50 mg % proline aan het vis-extrakt werden toegevoegd werd gemiddeld 96,3 % ($s = 3,1$ %) teruggevonden.

2.2.13.4. Reproduceerbaarheid.

De dubbelproeven gaven een standaardafwijking van 2,8 mg of een variatiecoëfficiënt van 3,7 % in het gebied 30 tot 120 mg %.

2.2.14. Hydroxyproline.

2.2.14.1. Werkwijze.

De methode van Neuman en Logan (1950) gemodificeerd door Blomfield en Farrard (1964) werd gekozen. Hierbij wordt hydroxyproline met waterstofperoxyde geoxydeerd ; met p-dimethylaminobenzaldehyde (Ehrlich-reagens) wordt dan een rode kleur bekomen.

Eén ml gefiltreerd trichloorazijnzuur-extrakt van doornhaai wordt in een maatkolf van 25 ml gepipeteerd. Men voegt 1 ml 0,05 M CuSO_4 , 1,5 ml 2N NaOH en 1 ml 6 % H_2O_2 toe en mengt zachtjes. De oxydatie wordt in een waterbad bij 40° C gedurende 20 min uitgevoerd ; het overtollig peroxyde wordt door hevig schudden vernietigd. De kolven worden in een ijsbad afgekoeld, 2 ml 6,5 N H_2SO_4 en 5 ml 3 % p-dimethylaminobenzaldehyde in n-propanol worden toegevoegd. De

kleurontwikkeling geschiedt bij 70° C gedurende 50 min. De kolven worden opnieuw afgekoeld, en onmiddellijk aangelengd met 40 % n-propanol. De extinktie wordt bij 560 nm gemeten.

2.2.14.2. Invloedsfactoren.

- Oxydatie-omstandigheden.

Blomfield en Farrard (1964) voeren de oxydatie bij 40° C gedurende 10 min uit.

Uit 10 vergelijkende proeven met concentraties van 5 tot 15 mg % uitgevoerd, bleek echter dat een tijd van 20 min significant hogere resultaten gaf (gemiddeld + 19,2 % met een spreidingsbreedte van + 2,3 tot + 25,6 %). Boven deze tijdsduur bleek geen vermeerdering meer voor te komen.

Stegemann (1958) stelde voor chloramine T i.p.v. H_2O_2 te nemen daar met dit reagens de gevoeligheid en de stabiliteit van het hydroxyproline-chromogeen verhoogd worden, vooral wanneer de gehalten zeer laag zijn.

In de concentraties waarin hydroxyproline echter in doornhaai voorkomt werd dit niet vastgesteld. Tien vergelijkende proeven in het gebied 5 tot 15 mg % gaven een verschil van + 2,5 % (spreidingsbreedte - 5,4 tot + 8,7 %) dat met een waarschijnlijkheid van 99 % niet significant bleek te zijn.

- Stabilisering van de kleur.

Bergman en Loxley (1963) vermeldten dat n-propanol, dat in de methode van Neuman en Logan als oplosmiddel voor het Ehrlich-reagens gebruikt wordt, een weinig stabiel chromogeen geeft. Zij stelden voor isopropanol te nemen.

Tijdens 10 dubbelproeven met 10 mg % hydroxyproline uitgevoerd werd dit feit echter niet vastgesteld. Noch de standaardafwijkingen (0,32 en 0,34 mg) noch de gemiddelden (9,8 en 10,3 mg) verschillen significant.

2.2.14.3. Rendement.

Wanneer hoeveelheden hydroxyproline van 5 tot 15 mg % aan het extrakt werden toegevoegd, werd gemiddeld 94,8 % ($s = 3,2$ %) teruggevonden.

2.2.14.4. Reproduceerbaarheid.

De dubbelproeven gaven in het gebied van 5 tot 21 mg % een standaardafwijking van 0,44 mg, hetzij een variatiecoëfficiënt van 3,4 %.

2.2.15. Vrij choline.

Bij alle gebruikelijke methoden voor de dosering van vrij (en gebonden) choline (met ammoniumreineekaat, perjodide, fosfomolybdaat) vormt de scheiding van betaïne en choline het hoofdprobleem. Daarenboven storen talrijke aminozuren in meer of minder sterke mate. Daar in doornhaai relatief veel betaïne voorkomt, diende een methode op punt gesteld te worden die de scheiding op eenvoudige wijze doorvoert en voldoende specifiek voor choline is.

Een aanpassing van de adsorptiemethode met florisil, door Lim en Schall (1964) voor de dosering van het totaal cholinegehalte in voeders voorgesteld, bleek aan deze eis te voldoen.

2.2.15.1. Werkwijze.

Men bereidt een dunne brij van 4 g florisil (Floridin Comp., Tallahassee, Florida, USA) in 10 ml methanol en laat 10 tot

15 sec bezinken. Men giet de fijne deeltjes die in suspensie blijven af en brengt de florisil op een kolom van 30 cm hoogte en 1 cm diameter door toevoegen van methanol over.

Een choline-oplossing (1 tot 4 mg) die vooraf op pH 2 tot 6 gesteld werd, wordt op de kolom gegoten. Men spoelt achtereenvolgens met 5 en 10 ml methanol en tenslotte met 10 ml 10 % aceton.

Men voegt 5 ml ammoniumreineekaats-oplossing (2 %) toe en wast de overmaat met 20 ml ijsazijn uit. Men elueert de roze band cholinereineekaats met 10 ml aceton en kolorimetreert bij 525 nm. Daar cholinereineekaats lichtgevoelig is (Ackerman en Salmon 1960) dient een sterke belichting (bv. rechtstreeks zonlicht) vermeden te worden en de metingen niet uitgesteld te worden. Proeven toonden verder aan dat telkens een nieuwe kolom dient gebruikt te worden.

2.2.15.2. Storende bestanddelen.

Proeven uitgevoerd met betaine, TMA, 15 aminozuren, creatine, creatinine (3 mg op kolom) en met ureum en TMAO (24 mg) toonden aan dat enkel TMA stoorde ($E = 0,190$). Voor de overige bepalingen werden extinktiewaarden van 0,003 à 0,022 t.o.v. aceton gevonden, terwijl de blankowaarde (water) gemiddeld 0,012 bedroeg. Het feit dat betaine geen invloed heeft kan hier benadrukt worden.

Voor de verwijdering van TMA werd volgende oplossing gevonden. Door toevoeging van base werd TMA vrijgesteld en in 10 min kwantitatief overgedestilleerd. Alhoewel het bekend is dat choline in basisch midden gemakkelijk in TMA overgaat bleek de hier toegepaste werkwijze (vooral de korte tijdsduur) slechts een verlies van $\pm 13\%$ te geven, dat goed reproduceerbaar was. Daarenboven was de ijkcurve na destillatie bepaald rechtlijnig.

Voor de praktische uitvoering worden 50 g vis met 100 ml trichloorazijnzuuroplossing 5 % gehomogeniseerd ; 40 ml van het filtraat worden in een destillatiekolf van 100 ml gebracht en met 10 % NaOH ($\pm 2,5$ ml) op pH 11-12 gebracht. Men destilleert gedurende 10 min., brengt op pH ± 5 met ijsazijn (± 1 ml) en voert de choline-bepaling uit zoals in 2.2.15.1.

Voor pas gevangen vis, die praktisch geen TMA bevat, kan het extrakt rechtstreeks op de kolom gebracht worden.

2.2.15.3. Rendement.

1 tot 8 mg % toegevoegd choline werden gemiddeld voor 97,4 % (s = 4,9 %) teruggedoseerd.

2.2.15.4. Reproduceerbaarheid.

De dubbelproeven gaven in het gebied van 3 tot 9 mg % een standaardafwijking van 0,27 mg aan, overeenkomend met een variatiekoëfficiënt van 4,5 %.

2.2.16. Betaïne.

Voor de bepaling van betaïne stellen zich dezelfde problemen als voor choline, nl. dat talrijke interfererende verbindingen voorkomen. Door het gebruik van een gemengde ionenwisselaar, zoals door Carruthers et al. (1960) voorgesteld, bleken choline en vrije aminozuren volledig geadsorbeerd te worden terwijl betaïne niet gebonden werd. TMA en TMAO kwamen daarentegen eveneens in het eluaat terecht en stoorden de reïneekaatsbepaling. TMA kon verwijderd worden door het TMA-reïneekaats bij pH 8,5-9 neer te slaan en af te filtreren. Dit slaagde echter niet met TMAO en pogingen om het met diverse reductiemiddelen (tin, titaanchloride, Dewarda's legering, koper) in TMA om te zetten bleven zonder gunstig resultaat. Er werd echter

vastgesteld dat TMAO met reïneekaart reproduceerbare resultaten geeft. Daar het gehalte afzonderlijk gedoseerd wordt (zie 2.2.3.) kon hier gemakkelijk een korrektiefaktor worden ingevoerd.

De kolorimetrische bepaling van betaïne met reïneekaart is gebaseerd op de methode van Glick (1944).

2.2.16.1. Werkwijze.

Men bereidt een kolom met 2 volumes De-Acidite FF (OH^-) en 1 volume Amberlite IRC-50 (H^+), volgens de voorschriften van Carruthers et al. (1960).

20 g vis worden met 200 ml 80 % ethanol gedurende 2 min gehomogeniseerd. Het filtraat wordt in een roterende vakuümverdampers tot 50 ml gereduceerd en over de kolom gebracht.

Men voegt bij 10 ml eluaat 10 ml 5 % ammoniumreïneekaartoplossing en brengt de pH op 8,5-9 met NaOH. Om het neerslaan te vergemakkelijken wordt de beker in een op -10°C gekoelde vloeistof geplaatst. Men filtreert op filtreerkroes G3 en brengt het filtraat op pH 1,2. Men koelt af, filtreert en wast het neerslag driemaal met ether (150 ml ether + 1 ml water). Het neerslag wordt in 70 % aceton opgelost en bij 525 nm gekolorimetreerd.

2.2.16.2. Rendement.

50 tot 100 mg betaïne werden voor 93,5 % ($s = 5,3 \%$) teruggevonden.

2.2.16.3. Reproduceerbaarheid.

De dubbelproeven gaven in het gebied van 60 tot 290 mg % een standaardafwijking van 9,6 mg aan, hetzij een variatiecoëfficiënt van 5,5 %.

2.2.17. Waterstofsulfide.

2.2.17.1. Werkwijze.

De methode van Brenner et al. (1953) werd toegepast. Het waterstofsulfide wordt door aanzuren van een visextract vrijgesteld en door een CO₂-stroom meegesleurd. Het wordt dan in een zinkacetaat-oplossing geabsorbeerd en met p-aminodimethylaniline, HCl en ijzer-III-chloride behandeld waardoor methyleenblauw ontstaat, dat bij 660 nm wordt uitgemeten.

Het visextract wordt bereid door 50 g doornhaai met 200 ml gedestilleerd water gedurende 2 min te homogeniseren en te filtreren ; 25 ml worden gebruikt.

2.2.17.2. Reproduceerbaarheid.

Voor hoeveelheden van 5 tot 25 µg % gaven de dubbelproeven een standaardafwijking van 0,28 µg aan, hetzij een variatiecoëfficiënt van 1,8 %.

2.2.18. Indol.

De methode van de AOAC (1960) werd toegepast.

Hierbij wordt indol uit een waterig extract overgedestilleerd en na extractie met chloroform, met p-dimethylaminobenzaldehyde kolorimetrisch bepaald.

2.2.19. Vluchtige reducerende stoffen (VRS).

2.2.19.1. Werkwijze.

Bij deze methode worden de vluchtige reducerende stoffen die in een bepaald tijdsinterval (meestal 40 min) door aëratie vrijkomen

globaal gedoseerd. De methode van Farber en Ferro (1956) werd hierbij toegepast. Het principe hiervan is als volgt. Een aëratiekolf en een reaktiekolf zijn met elkaar via een luchtpomp in gesloten kringloop verbonden. In deze twee kolven wordt respectievelijk vissap en kaliumpermanganaatoplossing gebracht. De luchtpomp brengt de vluchtige reducerende stoffen in de permanganaatoplossing over waar ze geoxydeerd worden. Door terugtitratie met natriumthiosulfaat wordt het aantal mikro-equivalenten VRS bepaald.

De methode van Farber en Ferro (1956) werd ongewijzigd gevolgd met uitzondering van de gebruikte luchtpomp. Er werd immers vastgesteld dat de reproduceerbaarheid van de bepalingen veel te wensen overliet wanneer een diafragmapomp gebruikt werd, zoals door deze auteurs opgegeven : de standaardafwijking, berekend uit veertig dubbelproeven in het gebied 5 tot 35 μ eq uitgevoerd, bedroeg 3,7 μ eq. De reden is dat het debiet moeilijk konstant kan worden gehouden, zelfs wanneer een aërometer wordt tussengeschakeld.

Na het testen van diverse olievrije pompen bleken slangenpompen (WAB, Basel, Zwitserland) de beste reproduceerbaarheid te geven. Daarenboven kunnen dergelijke pompen gemakkelijk aan éénzelfde as verbonden worden waardoor in ieder apparaat hetzelfde debiet wordt bekomen.

2.2.19.2. Extraktie van vissap.

Voor de VRS-bepaling is vissap nodig. Om dit te extraheren gebruiken Wittfogel en Gebhardt (1957) een elektrische centrifuge, Banks (1955), Farber en Ferro (1956) en Connell (1957) diverse typen mechanische of hydraulische persen. Voor doornhaai bleek een elektrische centrifuge wegens de gelatineuze consistentie van het visvlees niet te kunnen gebruikt worden. Ook het aanwenden van een hydraulische pers (Apex 10 ton, London) en verschillende soorten handpersen (type

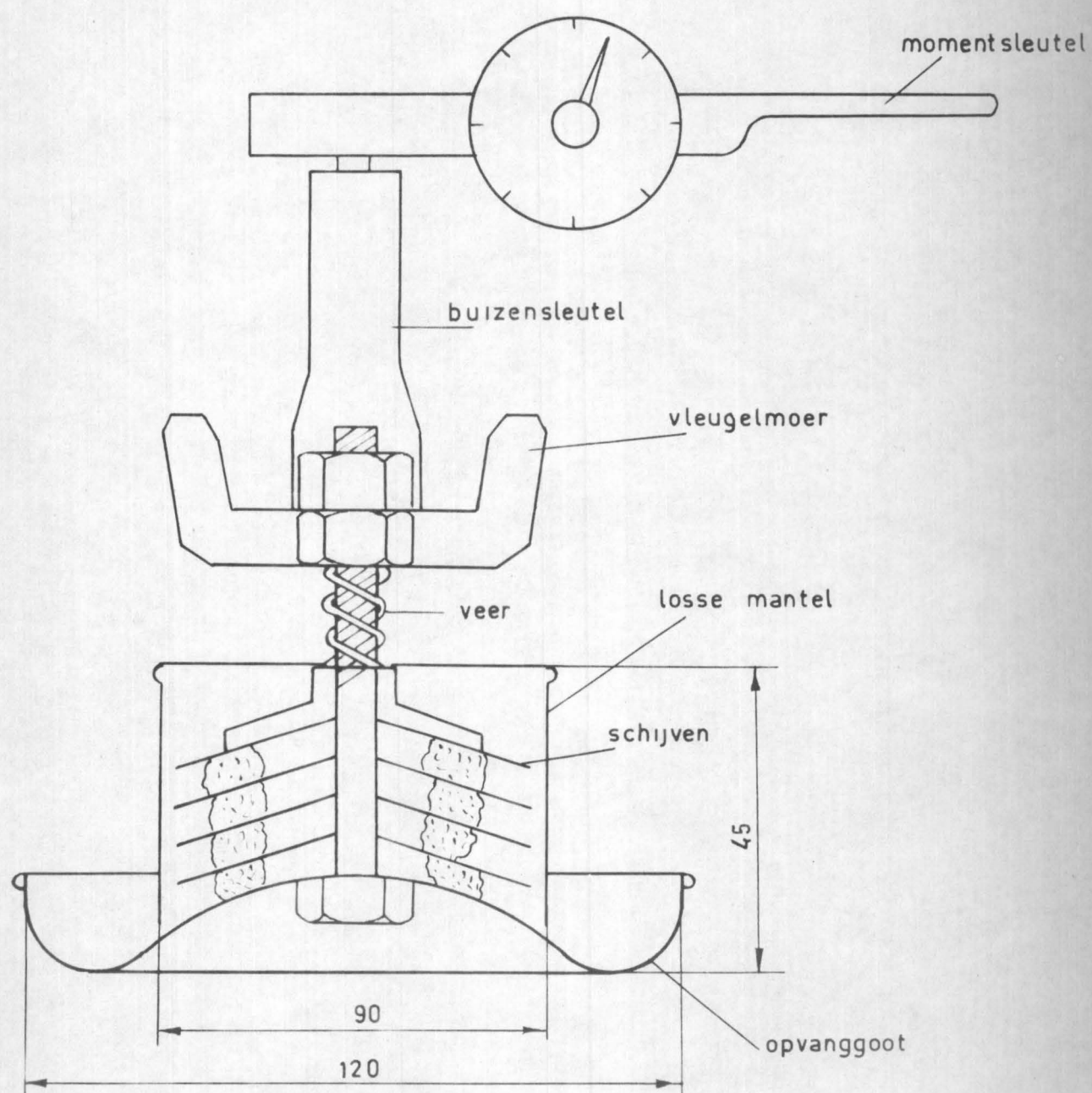


Fig. 17 PERS VOOR EXTRAKTIE VAN VISSAP

fruitpersen) bleek slechts een zeer gering rendement te geven en zeer omslachtig te zijn.

Om deze reden werd gepoogd een techniek op punt te stellen die toelaat op relatief eenvoudige wijze vissap uit doornhaai (en andere vissen) te extraheren.

Na talrijke oriënterende proeven bleek een kleine handpers met schijven, mits aanpassingen, uitstekend aan de gestelde eisen te beantwoorden.

Het is een kleine handpers uit gegalvaniseerd ijzer met licht konische schijven van 8,3 cm diameter (Presse Médicale AS, Parijs) (figuur 17). De schijven zijn geribd om het kontaktoppervlak te vergroten.

De nodige druk wordt bekomen door het aanspannen van een veer met behulp van een vleugelmoer. Ten einde de gewenste druk te kunnen instellen, werd de pers voorzien van een momentsleutel (Torquometer type TQC-1-FU, Snap-on Tools Corp., Kenosha, USA), die via een buizensleutel met de vleugelmoer verbonden werd ; hiervoor werd op deze laatste een moer van 17 mm gelast.

Voor iedere bepaling wordt 100 g vis, verdeeld in stukken van 5 tot 10 g gebruikt.

2.2.19.3. Invloedsfactoren.

Daar niets bekend was over de mogelijke invloed van factoren zoals druk, persduur, drukoppervlak, hoeveelheid vis, filtreren van het sap, enz. op het VRS-gehalte van het vissap, werd een uitgebreide reeks proefnemingen aan dit probleem gewijd.

De bovenvermelde factoren werden in 20 tot 30 vergelijkende proeven getest en de resultaten werden statistisch beoordeeld met de toets van de gepaarde vergelijkingen. Vis van uiteenlopende versheid (VRS-waarden : 5 tot 35 μeq) werd gebruikt.

De resultaten voor enkele vissoorten verschenen in een vroegere mededeling (Vyncke 1968 b). Voor doornhaai werden analoge resultaten bekomen. Enkel de druk bleek een significante invloed te hebben. Het gemiddeld verschil tussen de twee geëxperimenteerde drukken (0,35 en 0,50 kg/cm^2) bedroeg + 3,13 μeq of 18,4 % ten voordele van de hogere druk en was zeer significant. De speidingsbreedte van het verschil liep van 0 tot + 7,0 μeq .

Men dient dus rekening te houden met de persdruk voor de extraktie van vissap voor de VRS-bepaling bestemd.

2.2.19.4. Reproduceerbaarheid.

De standaardafwijking, berekend uit de dubbelproeven in het gebied 5 tot 35 μeq , bedroeg 1,5 μeq . Op te merken valt dat deze standaardafwijking duidelijk hoger ligt dan bij andere vissoorten waar in dezelfde omstandigheden 0,45 tot 0,97 μeq bekomen werd (Vyncke 1966). Dit is ongetwijfeld te wijten aan de meer gelatineuse consistentie van doornhaai, waardoor het vissap meer troebel (kolloïdaal) is en de reproduceerbaarheid van het diffusieproces meer wordt beïnvloed.

2.2.20. Totaal stikstofgehalte (Kjeldahl).

Volgende methode bleek optimale resultaten te geven : 0,5 g gemalen vis worden in een Kjeldahl-kolf van 100 ml afgewogen. Men voegt 3 g seleniummengsel volgens Wieningen (Merck) en 13 ml gekoncentreerd zwavelzuur toe. De destructie wordt gedurende twee uur uitgevoerd terwijl de warmte progressief wordt opgevoerd.

Men lengt aan tot 100 ml (maatkolf) en destilleert hiervan 20 ml met 20 ml NaOH 50 % (200 ml NaOH 50 % + 50 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 8 %) in een toestel van Antonacopoulos (1960) gedurende 20 min. Men vangt het destillaat in 10 ml boorzuur 3 % op en titreert met H_2SO_4 0,1 N t.o.v. een gemengde indikator voor stikstoftitraties (Mischindikator 5, Merck).

De dubbelproeven gaven een standaardafwijking van 0,028 % in het gebied van 3,40 tot 3,86 % N, hetzij een variatiecoëfficiënt van 0,77 %.

2.2.21. Droge stofgehalte.

5 g gemalen vis worden in een aluminium schaalje met zand vermengd en gedurende 4 uur bij 105° C gedroogd. Men laat ze vervolgens gedurende 1u30 in een dessicator afkoelen en weegt terug af.

2.2.22. Kathepsinen-aktiviteit.

De kathepsinen-aktiviteit werd bepaald volgens de methode van Anson (1938) gewijzigd door Siebert (1957). Hierbij wordt een extrakt van vis in 1 % KCl gedurende 15 min met een door ureum gedenatureerde hemoglobine-oplossing bij 37° C geïnkubeerd. Deze inkubatie werd bij pH 4,5 i.p.v. 4,3 zoals door Siebert voorgesteld, uitgevoerd daar uit de oriënterende proeven gebleken is dat deze pH voor doornhaai optimaal is (zie 4.2.2.16.).

De enzymenaktiviteit wordt door toevoegen van trichloorazijnzuur stopgezet, en de oplossing wordt ofwel bij 280 nm uitgemeten ofwel met fenolreagens behandeld en bij 760 nm gekolorimetreerd.

Deze laatste werkwijze werd verkozen. De methode van Lowry et al. (1951) gewijzigd door McDonald en Chen (1965) werd gevolgd.

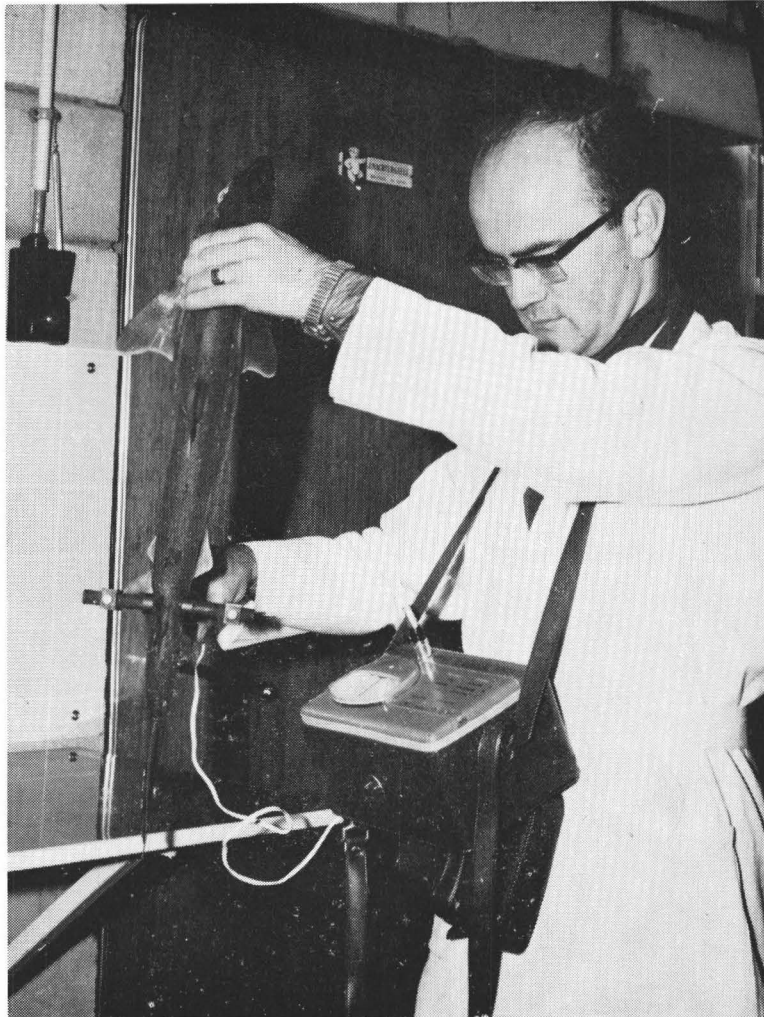


Fig. 18 — Meting van de elektrische weerstand met de „Intelectron Fish-tester”.

Deze methode blijkt gevoeliger dan de UV-techniek te zijn en laat de meting van zeer lage enzymenactiviteiten toe. De kleurontwikkeling geschiedt bij $\text{pH} \pm 10$ in een natriumcarbonaat-oplossing die natriumkaliumtartraat en kopersulfaat bevat. De resultaten werden in μg tyrosine/h/g vis uitgedrukt.

De dubbelproeven gaven in het gebied 150 tot 500 μg tyr een standaardafwijking van 15 μg tyr, hetzij een variatiecoëfficiënt van 4,8 %.

2.2.23. Aktiviteit van de neutrale endopeptidasen.

De kaseïnolytische methode van Kunitz (1947) werd toegepast. Een KCl-extrakt van vis wordt gedurende 30 min bij $\text{pH} 7,6$ in een kaseïne-oplossing geïnkubeerd. Na stopzetten van de proteolyse door trichloorazijnzuur wordt dezelfde werkwijze als voor de kathepsinen gevolgd.

De dubbelproeven gaven een standaardafwijking van 8,6 μg tyr in het gebied van 10 tot 380 μg tyr, hetzij een variatiecoëfficiënt van 4,4 %.

2.2.24. Elektrische weerstand.

De elektrische weerstand van het visweefsel werd gemeten met behulp van de "Intelectron Fish-Tester V" (Dethloff Electronics, Hamburg, W. Duitsland) (figuur 18), door Hennings (1963) op punt gesteld. De werking van het apparaat berust op de veranderingen in dielektrische eigenschappen die zich na de dood van de vis in de weefsels voordoen.

De konduktantie van de vis vermeerderd sterker dan de susceptantie en het apparaat meet het verband tussen beide grootheden door de admittantie bij twee frekwenties (1 en 16 kc/sec) te verge-

lijken. Een kwaliteitsindex Q wordt bekomen uit de verhouding van de impedanties Z_1 en Z_{16} , respektievelijk bij 1 en 16 kc/sec gemeten :

$$Q = \left[\frac{Z_1}{Z_{16}} - 1 \right] 100$$

Wanneer het bederf vordert en de konduktantie verhoogt, streeft Z_1/Z_{16} naar 1 en dus Q naar 0.

Eenvoudigheidshalve wordt dit verschijnsel in dit proefschrift verder "elektrische weerstand" genoemd.

2.2.25. pH-metingen.

De pH van het visweefsel werd rechtstreeks in dubbelgemalen vis gemeten met behulp van een gekombineerde glas-kalomel-elektrode met bolvormig uiteinde en een pH-meter Metrohm E350B.

2.2.26. Redoxmetingen.

De redoxpotentiaal werd op vissap gemeten met behulp van een gekombineerde platina-kalomelelektrode Metrohm EA217. De metingen werden onder stikstof en op een magnetische roerder uitgevoerd. De waarden werden na 5 min afgelezen.

2.3. Organoleptische keuring.

De diverse laboratoriumanalysen werden door een organoleptische keuring aangevuld. Voor de belangrijkste vissoorten bestaan in het buitenland enkele keuringsschema's. Een overzicht hiervan wordt door Wittfogel (1962) gegeven. Voor doornhaai echter bestaat geen enkel gedetailleerd schema, zodat het noodzakelijk was er zelf een op te stellen. In de eerste maanden van het onderzoek werd het schema

verschillende malen gewijzigd, vooral wat betreft de relatieve waarde van de diverse kwoteringen. Het definitief aangenomen schema is in tabel 4 weergegeven.

De keuring werd telkens door 3 tot 5 personen bestaande uit laboratoriumpersoneel en vaklui uitgevoerd op een totaal van 30 punten. Wegens praktische moeilijkheden was het echter niet mogelijk altijd dezelfde vaklui in de groep op te nemen.

Tabel 4 - Organoleptisch keuringsschema.

	<u>Kwoteringen</u>
<u>Oppervlakte en consistentie.</u>	
- Heldere kleuren ; een weinig doorschijnend slijm ; zeer vaste consistentie	6
- Minder heldere kleuren ; slijm melkig, doorschijnend ; elasticiteit verminderd	4
- Dof uitzicht ; meer slijm, geelachtig van kleur ; zachte consistentie	2
- Vuil uitzicht ; veel geelbruin slijm ; zeer zachte consistentie	0
<u>Ogen.</u>	
- Oogappel bolvormig ; hoornvlies klaar, glanzend ; pupil diepzwart	3
- Oogappel vlak ; hoornvlies opalescerend ; pupil opaak	2
- Oogappel ingezonken ; hoornvlies verbleekt, troebel, pupil melkig grauw	1
- Oogappel ingekrompen ; hoornvlies miskleurig ; pupil ondoorzichtig, met geelbruin slijm overtrokken	0

Tabel 4 - (vervolg).

	<u>Kwoteringen</u>
<u>Kieuwen</u> (na opensnijden van de kieuwplaten).	
- Kleur bloedrood ; klaar slijm	3
- Kleur rozerood ; ondoorschijnend slijm	2
- Kleur bruinrood, uitgewassen ; troebel geelachtig slijm	1
- Kleur vuil-bruin ; dik geelbruin slijm	0
<u>Buikholte.</u>	
- Nieren en bloed dieprood ; buikvlies glad, glanzend, vast aan buikwand ; geen rode kleur langs middengraat	6
- Nieren en bloed verbleekt ; buikvlies ruwer, minder vast ; roze kleur langs middengraat	4
- Nieren en bloed bruinrood ; buikvlies ruw, dof, van de buikwand af te trekken ; rode kleur langs middengraat	2
- nieren en bloed vuil-bruin ; buikvlies zeer ruw, gescheurd, los van de buikwand ; bruine kleur langs middengraat	0
<u>Geur van ingewanden en kieuwen.</u>	
- Geen onaangename geuren	6
- Minder frisse geur - eventueel lichte ammoniakgeur	4
- Ammoniakgeur met geuren van lagere vetzuren vermengd	2
- Sterke ammoniakgeur, gemengd met uitgesproken bedorven geur (H_2S , TMA, enz.)	0
<u>Geur van visvlees.</u> (te keuren op uitgesneden vismonsters)	
- Aangename, frisse geur	6
- Iets minder aangename geur, op melk of bier gelijkend	4
- Geur van lagere vetzuren, gemengd met lichte ammoniakgeur	2
- Sterke ammoniakgeur, gemengd met sterk bedorven geur (H_2S , TMA, enz.)	0

HOOFDSTUK 3 - INVLOED VAN BIOLOGISCHE FAKTOREN.

Als biologische factoren werden tijdens deze proeven onderzocht : geslacht, geslachtsrijpheid (ouderdom), seizoen en voeding.

3.1. Modus operandi.

3.1.1. Bepalen van het geslacht : bij *S. acanthias* levert dit geen moeilijkheden op daar het mannetje aan de binnenzijde van de buikvinnen twee paringsorganen heeft.

3.1.2. Bepalen van de ouderdom : geschiedt door het tellen van de jaarringen die op de rugdoornen aanwezig zijn (Holden en Meadows 1962). Bij voorkeur wordt hiervoor de achterste doorn gebruikt. De telling geschiedt zonder voorbehandeling van de doornen en voor kleinere exemplaren onder een vergrootglas. Op te merken valt echter dat wegens het vaak voorkomen van onduidelijke ringen of beschadigingen in slechts 45 % van de gevallen de ouderdom met zekerheid kon worden bepaald.

3.1.3. Bepalen van de geslachtsrijpheid : uit de literatuurgegevens (zie tabel 5) blijkt dat praktisch geen geslachtsrijpe mannetjes beneden de 60 cm voorkomen. Voor de wijfjes is deze grens 70 cm. Men kan aldus aan de hand van de lengte een indeling in geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe dieren doorvoeren. Daar echter in sommige gevallen een onvoldoend aantal individuen met kleine afmetingen kon worden bekomen, werden dan grotere klassen genomen en de geslachtsrijpheid van iedere vis bepaald.

Tabel 5 - Minimale en maximale grootte (in cm) van de doornhaai bij geslachtsrijpheid, in verschillende zeegebieden.

Auteur	Zeegebied	♂		♀	
		Min.	Max.	Min.	Max.
Ford (1921)	Kanaal	60	83	70	110
Hickling (1930)	Ierse Zee	62	-	70	-
Templeman (1944)	Newfoundland (Atlantische Oceaan)	60	86	74	101
Bonham et al. (1949)	Washington (Stille Oceaan)	72	100	92	124
Holden en Meadows (1964)	Schotland	-	-	70	98

- ♂ : Templeman (1944) toonde aan dat de lengte van de paringsorganen een goed criterium voor de geslachtsrijpheid is. De grens kan op 3 cm gesteld worden. In geval van twijfel dient de aanwezigheid van sperma in de zaadblaas als bevestiging.
- ♀ : de geslachtsrijpheid is hier meestal gemakkelijk te bepalen doch vereist het opensnijden van de abdomen. De meeste geslachtsrijpe wijfjes bevatten embryo's of ontwikkelde eieren. Deze laatste zijn groot en hebben een gele kleur zodat zij goed kunnen onderscheiden worden. In geval van twijfel is de breedte van de uterus determinerend : bij geslachtsrijpe wijfjes bedraagt deze minstens 3 cm (Templeman 1944).

3.1.4. Uitvoering.

Om de seizoeninvloed te kunnen nagaan werden over een periode van drie jaar (1965-68) per seizoen 10 vissen van iedere categorie onderzocht. Deze waren afkomstig van 2 à 4 vangsten in de bedoelde periode verricht. Alle doornhaaien werden zoals in 2.1.

vermeld behandeld. In totaal werden aldus van iedere categorie 120 individuen geanalyseerd.

De gegevens betreffende lengte en ouderdom van deze vissen werden in tabel 6 vermeld. Zoals vermeld in 3.1.2. kon de ouderdom maar op 45 % van de individuen worden bepaald. Men kan evenwel aan-nemen dat de vermelde gegevens met een goede benadering voor alle doornhaaien gelden.

Tabel 6 - Lengte en ouderdom van de aan het onderzoek onderworpen doornhaaien (a).

Kategorie	Lengte	Ouderdom(b)
$\overset{\uparrow}{0}$ niet geslachtsrijp	55 - 71 cm (58 cm)	4 - 8 j. (5 j.)
$\overset{\uparrow}{0}$ geslachtsrijp	68 - 85 cm (74 cm)	7 - 20 j. (14 j.)
$\overset{0}{+}$ niet geslachtsrijp	54 - 76 cm (66 cm)	4 - 12 j. (6 j.)
$\overset{0}{+}$ geslachtsrijp	78 - 98 cm (85 cm)	8 - 22 j. (15 j.)

(a) mediaan der waarnemingen tussen haakjes.

(b) bepaald op \pm 45 % van de vissen.

Op iedere vis werden volgende extraheerbare N-bestanddelen bepaald : ureum, ammonia, TMAO, creatine, creatinine, $\sqrt{\text{N}}$ -aminostikstof en peptiden. Het laatste jaar werden ook vrije choline, betaine en vrije aminozuren bepaald.

Daar het gehalte aan droge stof en het totale stikstofge-halte (Kjeldahl) in verband staan met het gehalte aan extraheerbare

N-bestanddelen en daarenboven goede indicatoren van de biologische toestand zijn, werden zij eveneens in het onderzoek betrokken. Ook de proteolytische aktiviteit (zure en neutrale endopeptidasen) werd bepaald.

Tenslotte werd een uitgebreide studie over de maaginhoud (voeding) van de doornhaai tijdens dezelfde periode verricht. Hiervoor werden echter naast de boven vermelde 480 vissen, ook 1.321 bijkomende vissen in de vismijn te Oostende onderzocht. Op te merken valt dat deze vissen 2 tot 8 dagen oud waren ; voor maagonderzoek echter vormt dit geen bezwaar. In totaal werden aldus 1.801 individuen, hetzij 20 tot 50 per seizoen en per groep naar geslachtsrijpheid ingedeeld, genomen.

3.1.5. Statistische analyse.

De resultaten van de verschillende analytische bepalingen werden aan een variantie-analyse onderworpen ten einde na te gaan of er tussen de gemiddelden van de 16 groepen (4 doornhaaigroepen per seizoen) significante verschillen voorkwamen.

Vóór iedere test werd eerst met de Hartley-toets (zie 2.2.) berekend of de verschillen tussen de varianties van de 16 groepen als toevallig of niet konden worden beschouwd.

Daarna werd de F-waarde volgens de gewone werkwijze bepaald (Snedecor 1962). De grenswaarde bedraagt hierbij 1,70 ($\alpha = 0,05$) of 2,10 ($\alpha = 0,01$) wanneer 16 groepen van 30 waarnemingen aanwezig zijn (464 vrijheidsgraden) en 1,75 ($\alpha = 0,05$) of ($\alpha = 0,01$) wanneer 16 groepen van 10 waarnemingen (144 vrijheidsgraden) in aanmerking te nemen zijn (choline, betaïne, vrije aminozuren en kathepsineaktiviteit). Wanneer de berekende F-waarde de grenswaarde overschreed werd met behulp van de Tukey-test nagegaan welke groepen wezenlijk verschilden.

Het minimum verschil werd berekend volgens :

$$\Delta = t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{2} \quad \text{met } n = \text{aantal waarnemingen per groep (10 of 30)}$$

De t-waarde bedraagt 1,97 ($\alpha = 0,05$) of 2,60 ($\alpha = 0,01$).

3.2. Resultaten en diskussie.

3.2.1. Maaginhoud (voeding).

Daar tussen de drie proefjaren weinig verschillen bleken voor te komen, werden de drie reeksen waarnemingen duidelijkheidshalve gegroepeerd.

Uit de gegevens van tabel 7 kan men besluiten dat de voeding van de doornhaai van het zuidelijk deel van de Noordzee niet aan seizoeninvloeden onderhevig blijkt te zijn. Evenmin is tussen wijfjes en mannetjes of tussen geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe dieren een duidelijk onderscheid vast te stellen. Bij de niet geslachtsrijpe (kleine) individuen komt enkel een ietwat groter percent schaaldieren voor. Dit kan wellicht verklaard worden door het feit dat kleinere doornhaaien bij voorkeur ondiep water opzoeken en dus vaker bij de bodem vertoeven (Hickling 1930).

Vis vormt het voornaamste voedsel en in dit verband kan erop gewezen worden dat de eerste onderzoekers, nl. Ford (1921) in Groot-Brittannië, Templeman (1944) en Fraser (1946) in Canada voorop stelden dat haring (*Clupea harengus* en *palasii*) het voornaamste voedsel van de doornhaai uitmaakt. Dit werd echter door Chatwin en Forrester (1953), Bonham (1954) en Holden (1966) weerlegd. Zij konden aantonen dat de doornhaai een "opportunist" is, die zich voedt met hetgeen hij het meest overvloedig kan vangen en geen voorkeur voor bepaalde vissoorten heeft.

Opmerkenswaardig is echter het hoog percentage Ammodytidae. De identificeerbare soorten waren de smelt (*Ammodytes lanceolatus* Lesauvage) en de zandspiering (*Ammodytes lancea* Yarrel).

Bij de Clupeidae waren vooral haring (*Clupea harengus* L) en in mindere mate ook sprot (*Clupea sprattus* L) aanwezig. Bij de Pleuronectidae werden de schol (*Pleuronectes platessa* L), de bot (*Pleuronectes flesus* L) en de schar (*Pleuronectes limanda* L) geïdentificeerd.

De gadidae omvatten vooral twee soorten, nl. kabeljauw (*Gadus morhua* L) en wijting (*Gadus merlangus* L).

De identificeerbare crustacea bestonden overwegend uit de zwemkrab (*Portunus holsatus*) en in mindere mate uit de heremietkreeft (*Eupagurus bernhardus*).

Tenslotte dient het groot percentage lege magen bijzonder genoteerd te worden (gemiddeld 49 %). Dit verschijnsel is ongewoon daar het in zeevissen meestal te wijten is aan een voedseltekort gebonden aan het seizoen, zoals bv. in de vissoorten van het Hoge Noorden, of aan de geslachtscyclus zoals in de haring. Beide oorzaken zijn echter uitgesloten voor doornhaai. De meeste auteurs die de voeding van *S. acanthias* onderzochten, stelden niettemin steeds een hoog percentage lege magen vast, en dit in alle werelddelen : Sato (1935), Templeman (1944), Bonham (1954) en Holden (1966) noteerden cijfers van 47 à 73 % hetgeen in de lijn van het hier verrichte onderzoek ligt. Holden kon hierbij aantonen dat de oorzaak niet diende gezocht te worden in een snellere vertering van de prooien, zoals door Aasen (1961) vooropgesteld, noch in het uitbraken van het voedsel tijdens de vangst, maar in het feit dat de doornhaai zich slechts intermitterend voedt.

Tabel 7 - Maaginhoud van doornhaai.

	♀ + geslachtsrijp				♀ niet geslachtsrijp			
	Lente	Zomer	Herfst	Winter	Lente	Zomer	Herfst	Winter
- Aantal vissen	150	150	75	73	150	150	85	70
- Zonder voedsel	42 %	57 %	45 %	51 %	61 %	53 %	42 %	41 %
- Niet geïdentificeerde vissoorten	24 %	15 %	26 %	24 %	17 %	29 %	26 %	25 %
- Vis	20 %	19 %	18 %	16 %	9 %	10 %	21 %	18 %
Ammodytidae	25 %	46 %	37 %	42 %	47 %	25 %	50 %	38 %
Clupeidae	20 %	10 %	12 %	15 %	15 %	18 %	15 %	8 %
Pleuronectidae	35 %	17 %	31 %	22 %	28 %	26 %	15 %	31 %
Gadidae	20 %	27 %	20 %	21 %	10 %	31 %	20 %	23 %
- Schaaldieren	8 %	5 %	8 %	6 %	8 %	7 %	9 %	10 %
Portunus	85 %	76 %	62 %	57 %	80 %	75 %	66 %	63 %
Eupagurus	15 %	24 %	38 %	43 %	20 %	25 %	34 %	37 %
- Vis + schaaldieren	6 %	4 %	3 %	3 %	5 %	1 %	2 %	6 %

Tabel 7 - Maaginhoud van doornhaai (vervolg).

	♂ geslachtsrijp				♂ niet geslachtsrijp			
	Lente	Zomer	Herfst	Winter	Lente	Zomer	Herfst	Winter
- Aantal vissen	150	150	75	68	150	150	83	77
- Zonder voedsel	60 %	52 %	43 %	45 %	42 %	50 %	40 %	44 %
- Niet geïdentificeerde vissoorten	21 %	16 %	15 %	18 %	14 %	20 %	21 %	16 %
- Vis								
Ammodytidae	38 %	28 %	29 %	45 %	37 %	25 %	39 %	44 %
Clupeidae	19 %	16 %	20 %	10 %	16 %	11 %	17 %	12 %
Pleuronectidae	23 %	34 %	20 %	20 %	25 %	29 %	22 %	16 %
Gadidae	20 %	22 %	33 %	25 %	22 %	35 %	22 %	28 %
- Schaaldieren	5 %	9 %	6 %	7 %	12 %	6 %	11 %	8 %
Portunus	77 %	76 %	75 %	66 %	73 %	73 %	60 %	80 %
Eupagurus	23 %	24 %	25 %	34 %	27 %	27 %	40 %	20 %
- Vis + schaaldieren	1 %	5 %	10 %	6 %	8 %	4 %	7 %	6 %

3.2.2. Individuele bepalingen.

Uit de berekende F-waarde volgt dat enkel α -amino-stikstof, peptiden, α -alanine, glutaminezuur, glycine, leucine en kathepsine-aktiviteit significante verschillen vertonen. Zoals verder zal besproken worden bleken deze verschillen voor alle geciteerde verbindingen, met uitzondering van de peptiden, tussen de geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe doornhaaien voor te komen. Voor de peptiden bleken de verschillen aan seizoeninvloed te wijten te zijn. De globale resultaten werden in tabel 8 opgenomen.

Tabel 8 - Resultaten van de bepalingen met significante verschillen met betrekking tot geslachtsrijpheid of seizoen.

Bepaling	F	Minimaal signifikant verschil ($\alpha = 0,01$)	Gemiddelde geslachtsrijpe doornhaaien	Gemiddelde niet geslachtsrijpe doornhaaien
α -aminostikstof (mgN%)	7,43	11	65 (s = 14)	79 (s = 15)
α -alanine (mg%)	3,06	16	18 (s = 12)	29 (s = 13)
glutaminezuur (mg%)	6,73	11	9 (s = 7)	22 (s = 10)
glycine (mg%)	3,29	42	51 (s = 32)	84 (s = 40)
leucine (mg%)	2,47	32	35 (s = 25)	56 (s = 29)
kathepsinenaktiviteit (μ g tyr/h/g)	1,96	54 (Σ)	206 (s = 61)	250 (s = 61)
			lente/zomer	herfst/winter
peptiden (mg N%)	5,96	9	63 (s = 14)	52 (s = 14)

(Σ) $\alpha = 0,05$.

De overige bepalingen werden noch door het geslacht, noch door de geslachtsrijpheid, noch door het seizoen beïnvloed. Hun resultaten werden dan ook gegroepeerd en de belangrijkste gegevens in tabel 9 vermeld.

Tabel 9 - Resultaten van de bepalingen zonder significante verschillen met betrekking tot geslacht, geslachtsrijpheid of seizoen.

Bepaling	I-waarde	Gemiddelde	Laagste waarde	Hoogste waarde	Standaard-afwijking	Variatie-koëfficiënt
Ureum	0,29	1.893 mg %	1.602 mg	2.195 mg	153 mg	8 %
Ammoniak	1,56	19,6 mgN%	6,0 mg	35,8 mg	5,7 mg	29 %
TMAO	1,37	201 mgN%	175 mg	225 mg	25 mg	12 %
Creatine	1,11	509 mg %	264 mg	649 mg	71 mg	14 %
Creatinine	1,51	53 mg %	17 mg	87 mg	17 mg	32 %
β -alanine	1,33	16 mg %	2,0 mg	30 mg	6,3 mg	39 %
Arginine	1,59	7,6 mg %	1,0 mg	21,9 mg	4,2 mg	55 %
Asparaginezuur	1,52	6,5 mg %	1,0 mg	19,3 mg	3,9 mg	60 %
Fenylalanine	1,60	9,9 mg %	0 mg	22,8 mg	4,8 mg	48 %
Sarcosine	1,59	52 mg %	9 mg	107 mg	23 mg	44 %
Serine	1,61	6,9 mg %	0 mg	20,8 mg	4,6 mg	52 %
Taurine	1,46	119 mg %	14 mg	277 mg	55 mg	46 %
Threonine	1,51	19 mg %	0 mg	63 mg	14 mg	73 %
Valine	1,62	5,0 mg %	0 mg	15,8 mg	3,3 mg	66 %
Proline	1,53	99 mg %	37 mg	138 mg	25 mg	25 %
Hydroxyproline	1,54	10,5 mg %	3,5 mg	19,2 mg	3,5 mg	30 %
Cysteine	1,44	8,2 mg %	2,1 mg	16,6 mg	3,3 mg	42 %
Cystine	1,67	9,4 mg %	1,8 mg	16,9 mg	3,6 mg	38 %
Choline	1,48	4,3 mg %	0,7 mg	11,0 mg	2,8 mg	65 %
Betaïne	1,70	98 mg %	29 mg	282 mg	60 mg	61 %
Totale stikstof	1,52	3,40 %	3,09 %	3,86 %	0,15 %	4,6 %
Droge stof	1,50	24,0 %	20,1 %	28,5 %	1,5 %	6,2 %

De volledige resultaten van de verschillende bepalingen werden in aanhangsel (tabellen A1 tot A29) opgenomen.

3.2.2.1. Ureum en ammoniak (tabellen A1 en A2).

Het gevonden algemeen gemiddelde van 1.893 mg % ligt hoger dan de resultaten van Simidu en Oisi (1951) die gemiddeld 1.700 mg % opgaven voor *S. acanthias* in Japanse wateren. Dezelfde auteurs vonden echter een hogere waarde voor ammoniak, nl. 23 t.o.v. 19,6 mg N %.

3.2.2.2. TMAO (tabel A3).

Het bekomen gemiddelde van 201 mg N %, met als uiterste waarden 175 en 225 mg, komt vrij goed overeen met de resultaten van vroegere auteurs (Beatty 1939 ; Norris en Benoit 1945 ; Dyer 1952) die gehalten van 190 tot 270 mg TMAO-N % in *S. acanthias* vonden.

Het feit dat het TMAO-gehalte niet aan seizoeninvloeden onderhevig is kan hier echter nader toegelicht worden. Inderdaad, verschillende onderzoekers (Ronold en Jakobsen 1947 ; Shewan 1951 ; Hughes 1959) vonden in diverse beenvissen (*Clupeidae*, *Gadidae*) een duidelijk hoger TMAO-gehalte in de wintermaanden, maar konden hier geen uitleg voor geven. Hughes suggereerde echter dat deze veranderingen wellicht in verband met de geslachtsyclus staan. Deze auteurs stelden ook vast dat het gehalte van de base met de ouderdom van de vis stijgt. Dit werd hier evenmin voor doornhaai vastgesteld.

Deze waarnemingen wijzen er nogmaals op dat er een fundamenteel verschil tussen beenvissen en kraakbeenvissen bestaat wat betreft de functie van het TMAO.

Zoals vermeld (zie 1.2.2.2.) zijn de meeste auteurs het eens dat de rol van het TMAO bij kraakbeenvissen in de osmoregulatie dient te worden gezocht. Het gehalte aan TMAO zou dus praktisch

alleen door de osmotische druk van het levensmilieu, de zee, worden beïnvloed.

Deze druk wordt hoofdzakelijk door het zoutgehalte en de temperatuur bepaald. In het zuidelijk gebied van de Noordzee varieert het zoutgehalte weinig ($\pm 0,05\%$) terwijl het grootste temperatuurverschil ongeveer 12°C bedraagt (ICES Oceanographic Data Lists 1966). De doornhaai zoekt echter bij voorkeur wateren van 7 tot 12°C op (Jensen 1966). Deze twee factoren zijn dan ook zeer waarschijnlijk niet bij machte om het osmotisch evenwicht sterk te beïnvloeden, zodat het niet significant verschil tussen de diverse TMAO-waarden hierdoor kan worden verklaard.

Indien men verder aanneemt dat de base ook uit het voedsel kan worden opgenomen (Benoit en Norris 1945 ; Ogilvie en Warren 1957 ; Hashimoto en Okaichi 1958, 1958b ; Okaichi et al. 1959), dan heeft het sterker TMAO-gehalte van de voedingsvissen in de wintermaanden in ieder geval geen invloed op het gehalte in de doornhaai zelf.

3.2.2.3. Creatine en creatinine (tabellen A4 en A5).

Het gemiddeld creatine-gehalte van 509 mg \% ligt hoger dan de door Shewan (1951) opgegeven waarden, nl. 350 tot 500 mg \% .

Voor creatinine kan opgemerkt worden dat de variaties in het visweefsel groter zijn dan deze van creatine.

3.2.2.4. Δ -aminostikstof (tabel A6).

Zoals vermeld duidt de berekende F-waarde van $7,43$ (tabel 8) op zeer significante verschillen tussen de 16 groepen. Toepassing van de Tukey-test toont aan dat het kleinste significant verschil 8 mg ($\Delta = 0,05$) of 11 mg ($\Delta = 0,01$) bedraagt. Uit tabel A6 is het duidelijk dat een wezenlijk verschil alleen tussen de niet geslachtsrijpe

en de geslachtsrijpe vissen bestaat. Tussen wijfjes en mannetjes blijkt geen verschil voor te komen. Evenmin werden seizoeninvloeden genoteerd. Op te merken valt echter dat de groep geslachtsrijpe mannetjes van de winterperiode (gemiddeld 57 mg) met 95 % waarschijnlijk wel significant van de overige groepen geslachtsrijpe doornhaaien verschilt. Op het 99 % niveau blijkt dit niet meer het geval te zijn. Er bestaat dan ook een betrekkelijk grote kans dat het gemiddelde van 57 mg toevallig abnormaal laag is.

De gemiddelde waarden, nl. 65 mg N % voor geslachtsrijpe en 79 mg N % voor niet geslachtsrijpe doornhaaien (tabel 8) wijken sterk af van het door Schaefer (1962 b) opgegeven gehalte aan α -amino-stikstof, nl. 143 mg N %. Men dient echter te noteren dat deze auteur slechts enkele individuen onderzocht en daarenboven de methode van Van Slijke toepaste voor de α -amino-bepaling. Andere gegevens over het α -amino-stikstofgehalte bij doornhaai worden in de literatuur niet aangetroffen.

Verschillende factoren kunnen het gehalte aan vrije aminozuren in vis beïnvloeden. Zo variëren verschillende aminozuren onder invloed van de voeding (Farris 1958 ; Lukton 1958). Uit tabel 7 blijkt dat dit voor de hier onderzocht doornhaai-groepen weinig waarschijnlijk is.

Ook de osmotische druk (zoutgehalte, temperatuur) van het zeewater kan een rol spelen. Florkin (1956) en Ranke (1959) stelden immers vast dat de vrije aminozuren een rol spelen in de osmoregulatie. Wegens de in 3.2.2.2. aangehaalde factoren en daar de niet geslachtsrijpe en de geslachtsrijpe dieren bovendien uit hetzelfde gebied afkomstig zijn, is het ook praktisch uitgesloten dat de gevonden verschillen aan een gewijzigde osmoregulatie te wijten zijn.

De oorzaak voor het hoger gehalte aan vrije aminozuren bij jonge dieren is ongetwijfeld te zoeken in het feit dat de meeste van deze zuren aan het eiwitmetabolisme deelnemen. Florkin (1956) wijst er in dit verband op dat de biochemische reacties die zich in de niet-eiwitstikstoffractie in de levende cel voordoen zeer intensief zijn. Bestendig worden eiwitten uit aminozuren gevormd terwijl anderzijds andere aminozuren uit eiwitten worden vrijgemaakt. In een jong organisme is het metabolisme door de intensere groei sterker zodat hierbij een hoger gehalte aan α -aminostikstof voorkomt. De gevoelige verandering in groeiritme vóór en na de geslachtsrijpheid blijkt hier trouwens goed mede in overeenstemming te zijn : vóór de maturiteit bedraagt het groeiritme 5 tot 10 cm per jaar, na deze fase 0,5 tot 3,5 cm per jaar (Templeman 1944 ; Bonham et al. 1949 ; Holden en Meadows 1962).

Het voorkomen van een hoger α -aminogehalte bij jonge individuen werd door Severin en Vul'fson (1959) bij steur (*Acipenser sturio*) en eveneens bij hogere dieren (eend, konijn) vastgesteld.

3.2.2.5. Peptiden (tabel A7).

Voor de peptiden wordt een F-waarde van 5,96 bekomen, hetgeen op zeer significante verschillen tussen de 16 groepen duidt. Toepassing van de Tukey-test geeft als kleinste significant verschil 7 mg ($\alpha = 0,05$) of 9 mg ($\alpha = 0,01$) op. Uit tabel A7 blijkt dat dit tussen de groepen herfst-winter enerzijds, lente-zomer anderzijds het geval is.

Noch de geslachtsrijpheid, noch het geslacht blijken een invloed te hebben.

Men kan aannemen dat door de hogere watertemperatuur in de lente-zomer-periode het stikstofmetabolisme versneld wordt, zodat meer

peptiden voorkomen.

Het feit dat in niet geslachtsrijpe doornhaaien een hoger gehalte γ -aminostikstof (zie 3.2.2.4.) bij eenzelfde hoeveelheid peptiden voorkomt en daarenboven enkel deze laatste door het seizoen worden beïnvloed, wijst er echter op dat de biochemische reacties die tot de vorming van vrije aminozuren en peptiden leiden niet op dezelfde wijze beïnvloed worden.

Mogelijke oorzaken hiervoor zijn dat de enzymenactiviteiten bij beide groepen verbindingen niet op dezelfde manier evolueren, dat de reaktiesnelheidskonstanten der verschillende reacties een andere temperatuursinvloed ondergaan en dat tenslotte de uitwisseling van de beide groepen verbindingen tussen het inter- en intracellulair vocht niet gelijk is en aldus de enzymatische reacties beïnvloedt.

De bewaarproeven brengen dit verschillend gedrag trouwens sterker tot uiting (zie 4.2.2.5.).

Uit tabel 7 volgt tenslotte dat een seizoeninvloed uit oorzaak van een gewijzigde voeding dient te worden uitgesloten.

Over het gehalte aan vrije peptiden en over de eventuele seizoeninvloeden bij *S. acanthias* worden in de literatuur geen gegevens gevonden. Voor de andere vissoorten zijn enkel de waarnemingen van Ranke (1960) bekend, die bij leng (*Molva vulgaris* L) eveneens in de zomerperiode een hoger peptidengehalte vond. Deze onderzoekster vond echter terzelfdertijd een lager α -aminogehalte en besloot hieruit dat in de zomer vooral de afbraakprocessen zowel van eiwitten als van aminozuren versneld worden. Deze waarnemingen komen dus slechts gedeeltelijk overeen met de in dit proefschrift bekomen resultaten over doornhaai.

3.2.2.6. Vrije aminozuren (tabellen A8 tot A20).

Uit de verschillende variantie-analysen, blijkt dat alleen bij α -alanine, glutaminezuur, glycine en leucine significante verschillen tussen de diverse visgroepen optreden. Uit de minimale waarden in tabel 8 vermeld en uit tabellen A8, A12, A13 en A14 volgt dat op één uitzondering na (α -alanine, 0 niet geslachtsrijp, winter/lente) geen significante seizoeninvloeden werden genoteerd. Evenmin heeft het geslacht een invloed op het gehalte aan vrije aminozuren.

Tussen de geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe groepen worden echter wel significante verschillen vastgesteld, alhoewel niet alle groepen hiervoor individueel in aanmerking komen. Globaal gezien echter kan besloten worden dat de kleine dieren significant meer α -alanine, glutaminezuur, glycine en leucine bevatten. Deze vaststelling is in overeenstemming met het hoger gehalte aan α -aminostikstof dat eveneens werd waargenomen (zie 3.2.2.4.). Op te merken valt daarbij dat ook bij andere aminozuren (arginine, asparaginezuur, threonine) voor de kleine doornhaaien in absolute waarden hogere gemiddelden genoteerd worden, maar dat deze statistisch niet significant zijn, en dit ongetwijfeld door de hoge standaardafwijkingen.

Zoals reeds vermeld komen over vrije aminozuren bij *S. acanthias* in de literatuur enkel kwantitatieve gegevens van Vul'fson (1961) voor (zie tabel 1). Wanneer men met de grote spreidingsbreedten rekening houdt, kan men besluiten dat de gevonden gehalten aan α -alanine, asparaginezuur, fenylalanine, glutaminezuur, glycine, leucine, sarcosine, serine, threonine en valine vrij goed met deze van Vul'fson overeenkomen.

Het gehalte aan β -alanine echter ligt beduidend lager, nl. gemiddeld 16 t.o.v. 105 mg %. Op te merken valt echter dat de Russische auteur slechts een gering aantal vissen heeft onderzocht, zodat deze hoge waarde toevallig kan zijn.

Ook het argininegehalte valt veel lager uit dan door Vul'fson opgegeven : gemiddeld 7,6 t.o.v. 50 mg %.

Volgens Schaefer (1962 b) die een semi-kwantitatieve techniek gebruikte zou anderzijds in doornhaai (en in andere Squalidae) meer arginine dan in beenvissen voorkomen. Deze vooropstelling kan hier niet zonder meer aanvaard worden daar de door ons gevonden waarden, nl. 1,0 tot 21,9 mg %), op ongeveer hetzelfde niveau liggen als voor diverse beenvissen gepubliceerde gegevens, nl. 2,4 tot 32,6 mg % (Sakaguchi en Simidu 1964 ; Konosu et al. 1964 ; Arahaki en Suyama 1966).

Fenylalanine, glutaminezuur, leucine, serine, threonine en valine konden in enkele gevallen niet gedetekteerd worden. Voor fenylalanine werd dit verschijnsel ook door Schaefer (1962 b) waargenomen die er echter een algemene regel van maakte, hetgeen door onze proeven tegengesproken wordt.

Volgende vrije aminozuren worden echter bij pas gevangen doornhaai in geen enkel geval waargenomen : methionine, tyrosine, tryptofaan, ornithine en histidine. Behalve voor de laatste twee aminozuren, werd dit feit ook door andere auteurs vastgesteld (zie tabel 1).

Vul'fson (1961) vond 25 mg % ornithine. Daar wij echter tijdens het bewaren van doornhaai dit aminozuur eveneens hebben gedetekteerd (zie 4.2.2.7.) bestaat de mogelijkheid dat de versheidsgraad bij de proeven van de Russische auteur verschillend was.

In tegenstelling met onze resultaten stelde Schaefer (1962 b) een matige hoeveelheid vrij histidine vast. Er dient echter opgemerkt te worden dat onze proeven uitsluitend op de witte spieren

(*M. longissimi dorsii*) werden uitgevoerd. Enkele aanvullende proefnemingen toonden echter aan dat in de rode spieren (*M. laterales superficiales*) wel vrij histidine voorkomt zodat de gegevens van Schaefer feitelijk niet tegenstrijdig zijn.

Lysine wordt slechts in 23 % van de gevallen waargenomen in concentraties die nooit 2 mg % overschrijden.

Wanneer men de gehalten aan vrije aminozuren die hier werden gevonden vergelijkt met de concentraties die voor diverse beenvissen werden gepubliceerd (Shewan 1953, 1955 ; B. Ranke 1955, 1959 ; E. Ranke 1960 ; Severin en Vul'fson 1959 ; Schaefer 1959, 1961, 1962, 1962 b, 1963 ; Simidu et al. 1958 ; Sakaguchi en Simidu 1964, 1965 ; Konosu et al. 1964 ; Arahaki en Suyama 1966 ; Ito 1959 ; Jones 1959 ; Hughes 1959), dan stelt men vast dat α -alanine, β -alanine, arginine, asparaginezuur, fenylalanine, glutaminezuur, serine, taurine, threonine, tyrosine en valine gehalten van dezelfde grootte-orde vertonen. Glycine, sarcosine, leucine, lysine en histidine wijken echter gevoelig af.

Het glycinegehalte in *S. acanthias* (gemiddeld 67 mg %) ligt op een hoger peil dan dit van de meeste beenvissen waar in vele gevallen een concentratie van 20 mg % niet wordt overschreden. Deze grotere hoeveelheid staat wellicht in verband met het duidelijk hoger gehalte aan bindweefsel nl. gemiddeld 11 % t.o.v. 2 tot 6 % voor beenvissen (Reay et al. 1943), daar glycine hierin bijzonder rijkelijk voorkomt.

Sarcosine wordt in beenvissen en in hogere dieren slechts in zeer geringe mate aangetroffen (Tallan et al. 1954). De relatief hoge gehalten in doornhaai mogen dan ook wel typisch genoemd worden en staan ongetwijfeld in verband met de hogere concentraties aan glycine en betaïne, daar deze verbindingen metabolisch met sarcosine nauw verwant zijn.

Het leucine-gehalte (gemiddeld 45 mg %) ligt gevoelig hoger dan in beenvissen, waar het meestal onder de 10 mg % ligt.

Lysine en histidine tenslotte, die in pas gevangen doornhaai weinig of niet aanwezig zijn, komen in beenvissen wel voor en dit in hoeveelheden die voor lysine tot 50 mg % en voor histidine tot 1.000 mg % (in pelagische vissoorten) kunnen gaan.

Anserine en carnosine werden tijdens onze proeven niet gedetecteerd. Dit bevestigt aldus de resultaten van de meeste auteurs die deze dipeptiden bestudeerd hebben (Schaefer 1962 ; Severin en Vul'fson 1959).

Evenmin werd l-methylhistidine, dat in anserine voorkomt, aangetroffen. Anserine en carnosine blijken aldus typisch voor beenvissen te zijn. Elasmobranchii, die meer primitieve dieren zijn, bevatten enkel β -alanine, de andere bouwsteen van beide dipeptiden. Volgens Severin en Vul'fson (1959) zou in de loop van de ontwikkeling van het organisme en de uitbouw van de spierfuncties, bij hogere wezens meer complexe verbindingen, zoals de twee dipeptiden uit β -alanine gesynthetiseerd zijn.

In tegenstelling met de Teleostii werd tijdens onze proeven geen seizoeninvloed in het gehalte aan vrije aminozuren vastgesteld. Dit feit werd reeds tijdens de bespreking van de α -aminostikstof nader toegelicht (zie 3.2.2.4.).

3.2.2.7. Cysteïne en cystine (tabellen A21 en A22).

In de literatuur worden beide aminozuren meestal samen bepaald en als cystine uitgedrukt.

Voor de Squalidae wordt enkel voor *Mustelus manazo* een concentratie van 29,9 mg % aangegeven (Sakaguchi en Simidu 1964).

Voor de Teleostii komen slechts enkele waarnemingen van Konosu et al. (1964) en Arahaki en Suyama (1966) voor (0,8 tot 3,2 mg %). In verschillende beenvisssoorten werden trouwens noch cysteïne noch cystine in vrije vorm aangetroffen (Sakaguchi en Simidu 1964). Uit deze gegevens blijkt dat het gehalte aan beide vrije aminozuren in Squalidae duidelijk hoger ligt.

3.2.2.8. Proline en hydroxyproline (tabellen A23 en A24).

Het relatief hoog gehalte aan beide iminozuren dient hier te worden benadrukt. In de literatuur zijn hiervoor bij *S. acanthias* geen waarden bekend. Voor beenvissen worden voor proline duidelijk lagere gehalten vermeld, nl. maximum 17,5 mg % (Arahaki en Suyama 1966). Vrij hydroxyproline wordt in pas gevangen beervis weinig of niet aangetroffen (Hughes 1961).

Daar beide iminozuren bijzonder rijkelijk in collageen voorkomen en hydroxyproline zelfs in andere eiwitten praktisch niet wordt aangetroffen, staat het hoger gehalte van deze zuren in doornhaai ongetwijfeld in verband met het hoger gehalte aan bindweefsel.

3.2.2.9. Vrij choline en betaine (tabellen A25 en A26).

Bij beide verbindingen vallen de hoge standaardafwijkingen op, hetgeen erop wijst dat zij aan grote variaties onderhevig zijn. Er kan hierbij echter worden opgemerkt dat de variatiecoëfficiënten tussen choline en betaine weinig verschillen.

Voor vrij choline zijn in de literatuur geen gegevens bekend. Het gemiddeld gehalte aan betaine (98 mg %) ligt lager dan door Shewan (1951) vermeld nl. 150 mg %.

3.2.2.10. Droge stof- en totaal stikstofgehalte (tabellen A27 en A28)

Zoals vermeld zijn het droge stof- en het totaal stikstofgehalte zeer goede indicatoren van de biologische gesteldheid van de vis en staan trouwens in verband met elkaar : een vermindering van het totale stikstofgehalte gaat meestal met een verhoging van het watergehalte van de weefsels gepaard.

Uit tabellen A27 en A28 volgt dat dit verschijnsel bij *S. acanthias* niet voorkomt en wordt bevestigd door de gegevens van de extraheerbare stikstofbestanddelen waar, met uitzondering van de peptiden, geen seizoeninvloeden worden vastgesteld. De doornhaai blijkt in dit verband sterk af te wijken van de meeste andere vissoorten, waar wel duidelijke seizoeninvloeden te bespeuren vallen. Als voorbeeld kan hier kabeljauw worden aangehaald, waar het droge stofgehalte in de lente duidelijk lager ligt dan in de andere seizoenen (17 % t.o.v. 20 %) (Love 1960).

Voor het verschillend biologisch gedragingspatroon bij de doornhaai kunnen ongetwijfeld vooral twee redenen worden opgegeven. Eerst en vooral is uit de waarnemingen over de maaginhoud (zie 3.2.1.) gebleken dat er in de voeding geen seizoenverschillen te noteren zijn en dat de doornhaai intermitterend het voedsel opneemt dat hij het meest overvloedig ter beschikking vindt. Lange perioden van voedselgebrek, die soms bij andere vissoorten voorkomen, worden niet vastgesteld.

Een tweede reden is dat de geslachtscyclus bijzonder lang is, nl. 48 maanden (zie 1.1.) zodat de veranderingen in de samenstelling van de visweefsels, die hiermede gepaard gaan en bij de meeste andere vissen sterk tot uiting komen, ongetwijfeld zeer verminderd zijn ; het organisme van de doornhaai heeft meer tijd om zich aan de noodwendigheden van de geslachtscyclus aan te passen.

3.2.2.11. Proteolytische activiteit (tabel A29).

De activiteit van de neutrale endopeptidasen blijkt in pas gevangen doornhaai zeer gering te zijn. Zij werd dan ook niet verder statistisch verwerkt. De activiteit van de kathepsinen daarentegen ligt op een hoog peil en vertoont daarenboven significante verschillen (tabel 8). Toepassing van de Tukey-test geeft als minimaal wezenlijk verschil tussen de diverse groepen $54 \mu\text{g tyr/h/g}$ aan. Uit tabel A29 is het duidelijk dat de activiteit bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien significant hoger dan bij de geslachtsrijpe dieren ligt. Dit verschil bedraagt gemiddeld 21 %.

Voor *S. acanthias* worden in de literatuur geen gegevens over de proteolytische activiteit gevonden. De kathepsinenactiviteit echter ligt lager dan de waarden die Siebert (1958) rapporteert voor diverse beenvissen, nl. 460 tot $1.035 \mu\text{g tyr/h/g}$.

3.3. Besluiten.

Uit het onderzoek van de biologische factoren is vooreerst gebleken dat de voeding van de doornhaai niet door het seizoen beïnvloed wordt. Evenmin is tussen wijfjes en mannetjes of tussen geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe dieren een onderscheid vast te stellen. Dit feit is belangrijk daar de significante verschillen die bij diverse verbindingen werden waargenomen, in ieder geval niet door een gewijzigde voeding veroorzaakt zijn.

De kleine, niet geslachtsrijpe doornhaaien bevatten significant meer α -aminostikstof, α -alanine, glutaminezuur, glycine en hebben een sterkere kathepsineactiviteit.

Het peptidengehalte wordt daarentegen door het seizoen beïnvloed : in de lente-zomer-periode is het gehalte hoger dan in de

herfst-winter-periode. Overige extraheerbare stikstofverbindingen blijken noch door het geslacht, noch door de geslachtsrijpheid, noch door het seizoen te worden beïnvloed.

De gegevens over de vrije aminozuren bevestigen globaal gezien de waarnemingen van Florkin (1956), Ranke (1959), Schaefer (1959) en Partmann (1965) die vaststelden dat in iedere vissoort een specifieke "aminozurenpool" voorkomt.

Vergeleken met de meeste beenvissen onderscheidt *S. acanthias* zich door (a) hoge gehalten aan glycine, leucine, cysteine, cystine, proline, hydroxyproline en sarcosine, (b) het weinig of niet voorkomen van lysine en histidine.

HOOFDSTUK 4 - EVOLUTIE VAN DE EXTRAHEERBARE STIKSTOFVER- BINDINGEN TIJDENS HET BEWAREN VAN S. ACANTHIAS.

4.1. Modus operandi.

4.1.1. Bewaarproeven.

Per seizoen werd één bewaarproef per categorie uitgevoerd. Hiervoor werden zoveel mogelijk voor de geslachtsrijpe en de niet geslachtsrijpe doornhaaien respektievelijk de grootste en de kleinste individuen genomen. De vissen werden hiervoor zorgvuldig gestript, gewassen en in ijs bij $\pm 1^{\circ}$ C bewaard.

Na respektievelijk 2, 5, 9, 12 en 19 dagen (± 1 dag) werden de in 3.1.4. vermelde extraheerbare stikstofbestanddelen gedoseerd. Daarenboven werden ook de pH, de VRS en de elektrische weerstand van het visvlees bepaald, daar deze methoden eveneens door de extraheerbare stikstofbestanddelen worden beïnvloed en daarenboven bij andere vissen als goede objektieve versheidstesten worden aangezien (overzicht bij Farber 1965). Per proef werden volgens de beschikbare hoeveelheid 3 tot 10 vissen genomen.

Tijdens deze bewaarproeven werden tenslotte twee reeksen aanvullende experimenten uitgevoerd. In de eerste reeks werd het uitloogeffekt (uitloggen van de extraheerbare N-bestanddelen onder invloed van het smeltend ijs) bepaald, in de tweede reeks werd het verschil tussen geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe vissen nader onderzocht.

4.1.2. Uitloogproeven.

De proeven werden met geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe dieren verricht en werden driemaal herhaald. Tien kg vis en tien kg ijs werden in een polyethyleen bak, waarvan de bodem van talrijke

openingen van 1 cm diameter voorzien was, gebracht. Deze bak werd op een analoog recipiënt geplaatst, waarin 1 liter 10 % zoutzuur gegoten werd ten einde de enzymatische en bakteriële aktie te verhinderen en tevens zoveel mogelijk de vluchtige basische verbindingen (TMA en NH_3) vast te houden.

Het overblijvend ijs werd telkens respektievelijk de 5de, 9de, 12de en 19de dag zorgvuldig van de vis verwijderd en bij de verdunde zoutzuuroplossing gevoegd. Nieuw ijs werd aan de vis toegevoegd en een nieuwe HCl-oplossing in de onderste bak gegoten. Nadat het verwijderd ijs volledig gesmolten was, werd het volume gemeten, de oplossing indien nodig in vakuüm ingedampt en het gehalte aan TMAO, TMA, ureum, ammoniak, α -amino, creatine en creatinine, proline en hydroxyproline, cysteïne en cystine, bepaald.

Creatine en creatinine werden samen gedoseerd, daar creatine in zuur midden gemakkelijk in creatinine overgaat. Daar deze laatste verbinding echter in veel geringere hoeveelheden voorkomt, geven de resultaten hoofdzakelijk het uitgelopen creatine-gehalte aan. Proline en hydroxyproline werden eveneens samen bepaald, daar blankoproeven in dezelfde omstandigheden uitgevoerd, uitgewezen hadden dat een gedeelte van het proline tot hydroxyproline geoxydeerd werd. Ook cysteïne en cystine werden om dezelfde reden samen bepaald.

4.1.3. Vergelijkende proeven tussen geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe doornhaaien.

Vier monsters, ieder bestaande uit 3 tot 10 stukken vis uit de epaxiale spieren gesneden, werden gebruikt :

NG : niet geslachtsrijpe doornhaai, $\pm 15 \times 1,5 \times 1,5$ cm

G1 : geslachtsrijpe doornhaai, kleine metamerie, $15 \times 1,5 \times 1,5$ cm

G2 : idem, grote metamerie, 15 x 1,5 x 1,5 cm

G3 : idem, dubbele dikte, 15 x 3 x 3 cm

De monsters werden in ijs bewaard en verder zoals in de proeven op gehele vissen behandeld. De proeven werden driemaal herhaald.

4.2. Resultaten en diskussie.

De gemiddelde resultaten werden in figuren 20 tot 41 en 44 tot 58 grafisch voorgesteld. De volledige waarnemingen van de proeven die over drie jaar verricht werden, zijn in aanhangsel opgenomen (tabellen A30 tot A42).

Vooraleer tot de bespreking van de verschillende resultaten over te gaan, kan er onmiddellijk op gewezen worden dat uit bovenvermelde figuren en tabellen volgt dat bij geen enkele proef een invloed van het geslacht of van het seizoen werd waargenomen. Deze factoren blijken aldus tijdens het bederf van *S. acanthias* geen determinerende rol te spelen.

4.2.1. Uitloogproeven.

Uit de uitloogproeven (tabellen 10 en 11) blijkt dat het spoeleffect van het smeltwater voor alle proeven, TMA en ammoniak uitgezonderd, het sterkst is gedurende de eerste negen dagen. Aanzienlijke hoeveelheden extraheerbare stikstofbestanddelen worden tijdens deze periode uitgeloozd.

Dat tijdens de verdere bewaring veel minder verbindingen uitdiffunderen kan verklaard worden door het feit dat de consistentie van de doornhaai tijdens het bederf door de afbraak van de relatief grote hoeveelheden bindweefsel die zich in deze kraakbeenvis bevinden meer en meer gelatineus wordt. Deze gelatineuze consistentie remt in sterke mate de diffusie in het smeltwater. Naast de organoleptische

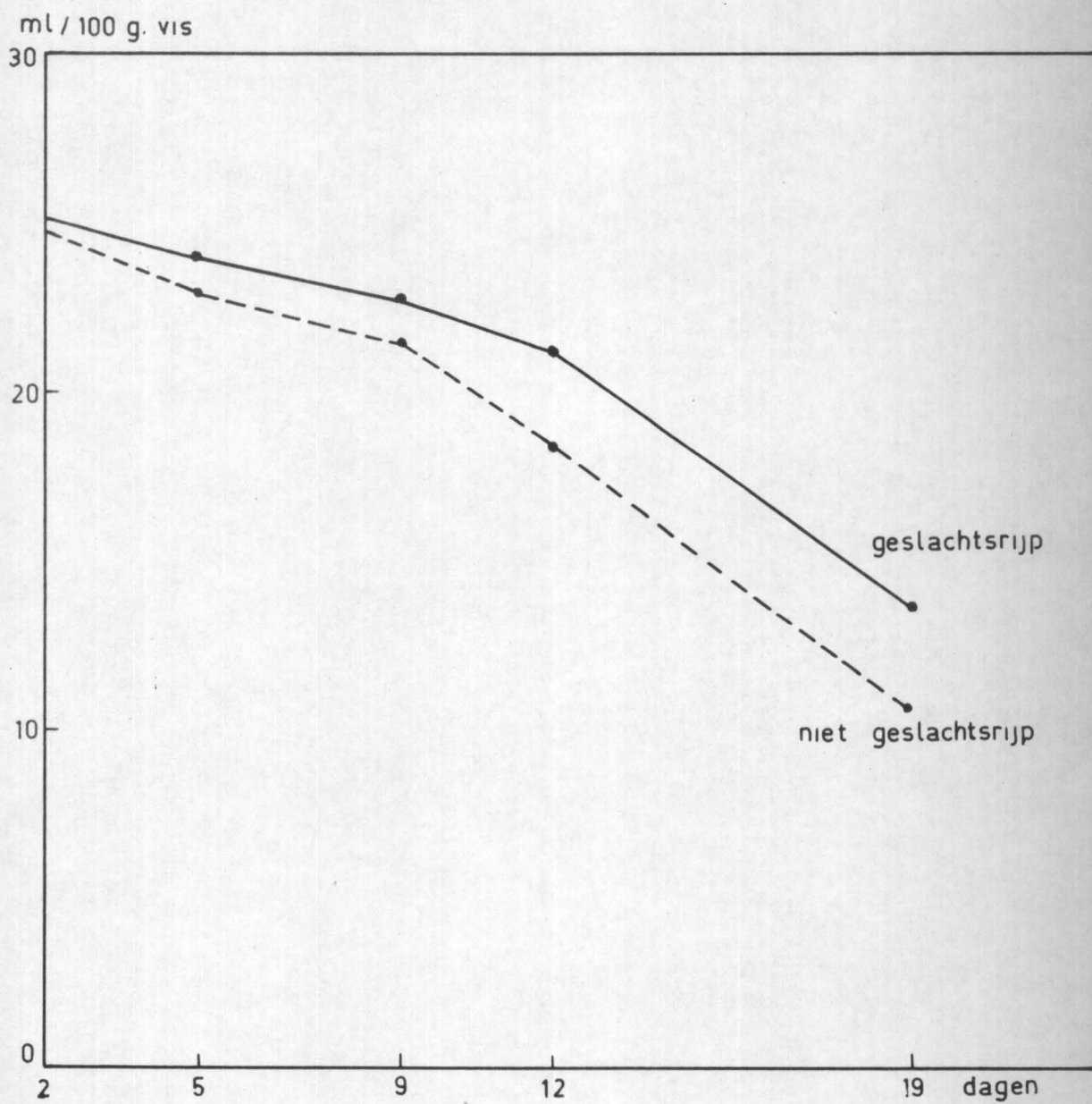


Fig.19 – Verloop van het aantal ml perssap tijdens het bewaren van *S. acanthias*

waarneming geeft het aantal ml perssap hiervan een duidelijk beeld. Het werd twintigmaal onder konstante druk bepaald (zie 2.2.19.2.). Het gemiddeld verloop ($s = 1,5$ ml) werd in figuur 19 afgebeeld. Hieruit blijkt dat bij beide groepen vooral tussen de 12de en de 19de dag een sterke vermindering van het aantal ml te noteren valt. Bij de niet geslachtsrijpe dieren wordt daarenboven vanaf de 12de dag een duidelijk lagere waarde bereikt dan bij de geslachtsrijpe vissen.

Bij de kleine vissen wordt trouwens meestal een groter spoel-effekt vastgesteld. De reden hiervan dient gezocht in het feit dat kleine vissen een relatief groter oppervlak en een kleinere laagdikte vertonen zodat de diffusie gemakkelijker doorgaat.

Voor TMA en ammoniak daarentegen grijpt het sterkste verlies tussen de 12de en de 19de dag plaats.

Tenslotte dient opgemerkt dat deze spoelproeven enkel onderling vergelijkbare resultaten geven. Deze mogen aldus niet rechtstreeks met de gegevens van figuren 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 44, 45, 47 en 48 worden vergeleken daar de proefomstandigheden niet toelieten alle uitgeloogde extraheerbare stikstofverbindingen terug te vinden. Niettemin wordt voor de verbindingen waarvan tijdens het bederf normalerwijze geen nieuwvorming mag worden verwacht (TMAO, ureum, creatine) een zeer goede overeenkomst met de resultaten van figuren 22, 24 en 25 waargenomen. Een sterkere daling van de concentratie komt hierbij altijd overeen met een groter spoeleffekt.

Tabel 10 - Uitgeloogde N-verbindingen bij geslachtsrijpe doornhaaien
(koncentraties per 100 g vis).

Verbinding	Proef	5 d	9 d	12 d	19 d
TMAO (mg N %)	1	11	26	10	5
	2	7	35	15	7
	3	10	21	8	9
	Gem.	9	27	11	7
TMA (mg N %)	1	0	2	3	3
	2	0	3	5	5
	3	0	2	5	3
	Gem.	0	2	4	4
Ureum (mg %)	1	95	382	152	42
	2	116	510	94	35
	3	108	337	80	20
	Gem.	106	409	108	32
Ammoniak (mg N %)	1	5	10	12	20
	2	8	4	8	11
	3	3	6	14	14
	Gem.	5	7	11	15
Creatine + creatinine (mg %)	1	35	20	15	5
	2	51	31	25	12
	3	40	18	12	7
	Gem.	42	23	17	8
α-amino-N (mg N %)	1	6	10	12	3
	2	8	6	5	2
	3	4	8	6	5
	Gem.	6	8	8	3
Peptiden (mg N %)	1	2	9	1	1
	2	5	7	5	2
	3	3	12	3	4
	Gem.	3	9	3	2
Proline + hydroxyproline (mg %)	1	20	7	2	1
	2	14	10	4	3
	3	18	5	1	—
	Gem.	14	7	2	1
Cysteïne + cystine (mg %)	1	0,5	1,4	0,4	0,2
	2	1,2	0,8	0,2	0,3
	3	0,3	0,5	0,6	0,5
	Gem.	0,7	0,9	0,4	0,3

Tabel 11 - Uitgeloogde N-verbindingen bij niet geslachtsrijpe doornhaaien (koncentraties per 100 g vis).

Verbinding	Proef	5 d	9 d	12 d	19 d
TMAO (mg N %)	1	14	22	9	9
	2	12	15	12	4
	3	20	14	14	7
	Gem.	15	17	12	7
TMA (mg N %)	1	0	4	5	2
	2	0	3	6	6
	3	0	3	3	3
	Gem.	0	3	5	4
Ureum (mg %)	1	151	160	43	50
	2	123	302	70	27
	3	165	256	51	22
	Gem.	146	239	55	33
Ammoniak (mg N %)	1	10	9	15	25
	2	8	12	20	18
	3	6	7	12	18
	Gem.	8	9	16	20
Creatine + creatinine (mg %)	1	45	18	20	4
	2	63	15	17	5
	3	50	10	12	8
	Gem.	53	11	16	6
α -amino-N (mg N %)	1	8	8	12	6
	2	12	15	7	2
	3	4	11	5	3
	Gem.	8	11	8	4
Peptiden (mg N %)	1	5	15	3	2
	2	8	10	5	3
	3	4	12	2	1
	Gem.	6	12	3	2
Proline + hydroxyproline (mg %)	1	32	6	2	4
	2	21	5	6	1
	3	13	4	1	2
	Gem.	22	5	3	2
Cysteïne + cystine (mg %)	1	2,4	2,0	0,4	0,1
	2	1,3	4,2	1,1	0,2
	3	3,0	1,6	0,3	0,6
	Gem.	2,2	2,6	0,6	0,3

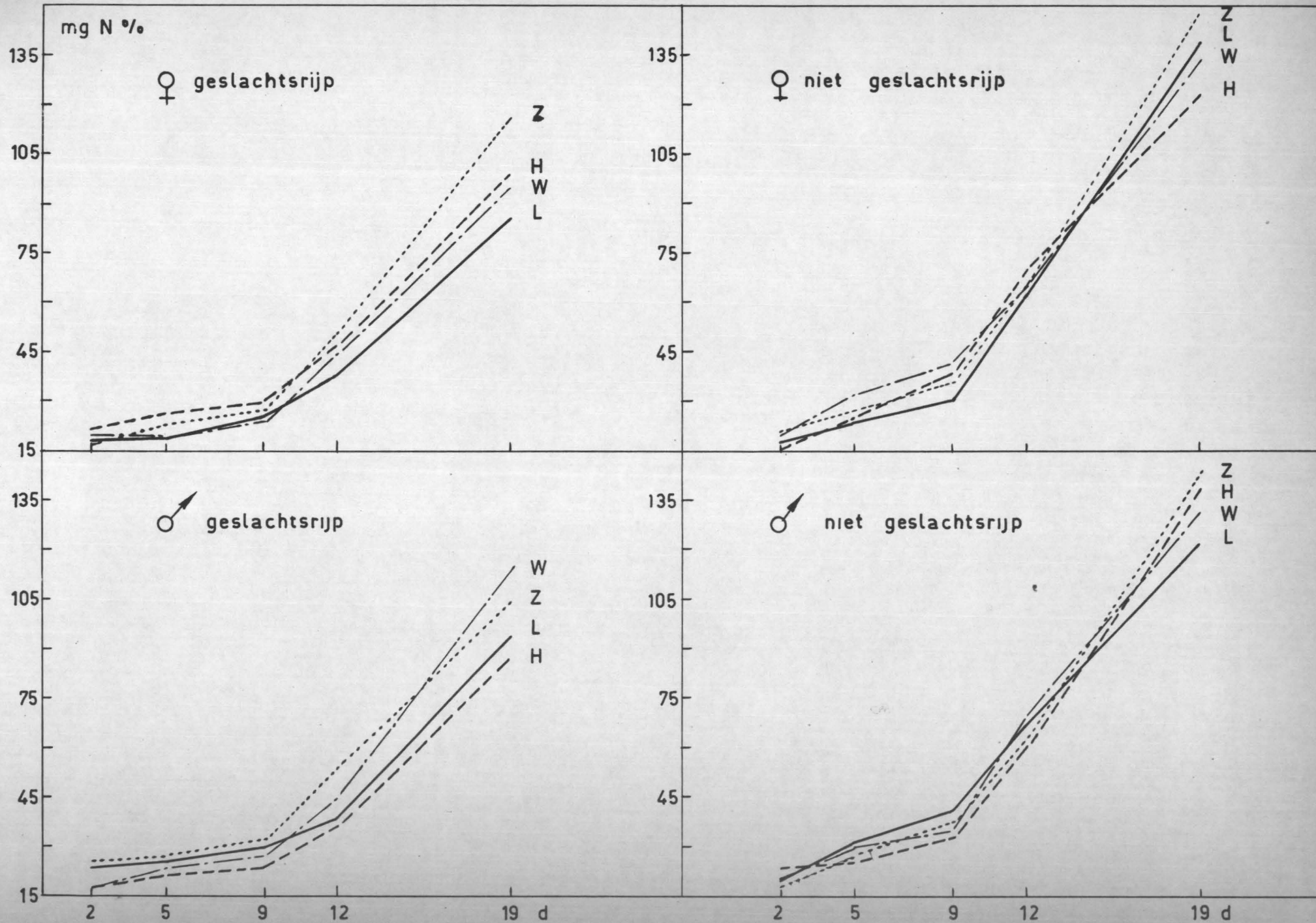


Fig. 20 - Verloop van ammoniak in *S. acanthias* tijdens het bewaren

4.2.2. Individuele bepalingen.

4.2.2.1. Ammoniak (figuur 20, tabel A30).

De eerste negen dagen van de bewaarperiode grijpt slechts een geringe vermeerdering van het gehalte aan vrije ammoniak bij geslachtsrijpe dieren plaats. Vanaf de negende dag echter stijgt de curve zeer vlug.

Voor niet geslachtsrijpe dieren daarentegen wordt een ander beeld bekomen. De vermeerdering van vrije ammoniak grijpt hier vroeger plaats en bereikt na 19 dagen hogere waarden, nl. gemiddeld 136 t.o.v. 101 mg N %.

Deze resultaten komen gedeeltelijk met deze van Shewan (1951) overeen, die echter geen melding gemaakt heeft van de grootte (geslachtsrijpheid) van de vissen. Deze auteur stelde enkel na 8 tot 10 dagen een duidelijke stijging van de vrije ammoniak bij doornhaai van de Noordzee vast, nl. van ongeveer 10 mg tot 115 mg na 21 dagen.

Moyer et al. (1959) en Southcott et al. (1960) echter vonden tijdens het bewaren van *S. acanthias* slechts een geringe stijging van het ammoniakgehalte, dat nooit 20 mg N % overschreed. Hetzelfde beeld werd trouwens voor TMA bekomen (zie 4.2.2.3.). Stansby et al. (1968) bekwamen later ongeveer dezelfde resultaten. Deze auteurs werkten echter op doornhaai van de Noord-Amerikaanse kusten en Moyer et al. (1959) suggereren als oorzaak van deze abnormaal lage waarden, de afwezigheid van een urease-vormende bacteriepopulatie. Vergelijkend bakteriologisch onderzoek zou noodzakelijk zijn om dit te bewijzen maar in ieder geval is uit onze proeven gebleken dat er een verschil in bederfsnelheid tussen de Europese en de Noord-Amerikaanse doornhaai bestaat.

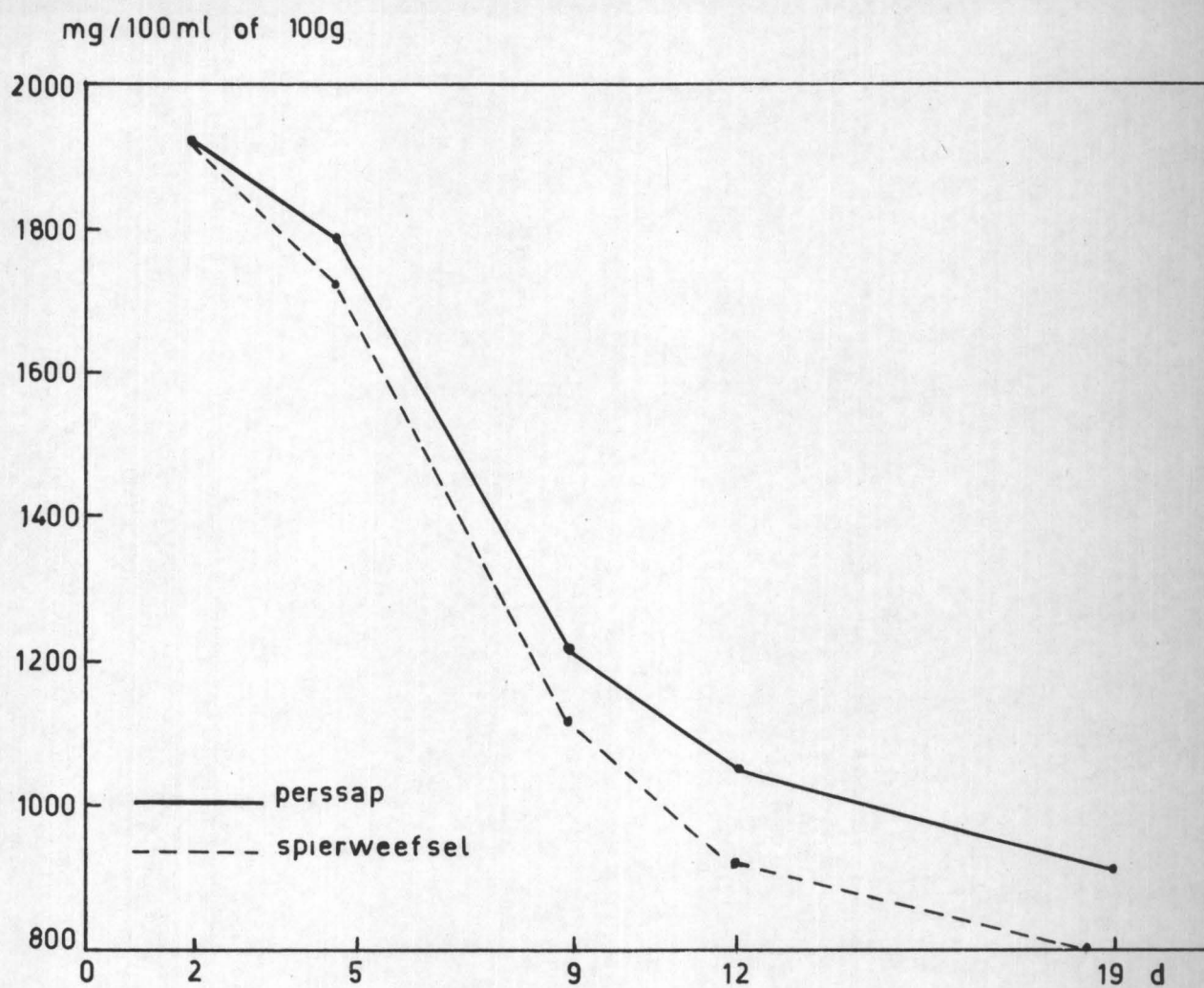


Fig. 21 - VERLOOP VAN HET UREUMGEHALTE

TIJDENS HET BEWAREN VAN S. ACANTHIAS

Volgens Suyama et al. (1950) zou bij haaiachtigen een stationaire faze in de afbraak van ureum tot ammoniak voorkomen, hetgeen op de vorming van bepaalde intermediaire verbindingen zou wijzen. Anderzijds meldden Simidu en Hibiki (1953) dat in bepaalde omstandigheden een vertraging of stopzetting van de ureumafbraak kan optreden. Volgens deze auteurs zou dit te wijten zijn aan het feit dat ureum zowel binnen als buiten de spiercellen voorkomt en dat de bacteriën eerst de intercellulaire base aanvallen. Het intracellulaire ureum moet dan door de celwand diffunderen, hetgeen een trager proces is.

Beide verschijnselen werden tijdens de hier beschreven proeven op doornhaai echter niet vastgesteld.

Om hierover een nader inzicht te bekomen werd het ureumgehalte van het perssap van geslachtsrijpe doornhaai bepaald. Dit sap werd onder konstante druk ($0,5 \text{ kg/cm}^2$) uitgeperst (zie 2.2.19.2.) en volgens de proeven van Banks (1955), Love (1955) en Connell (1957) bestaat het voor pas gevangen vis bijna uitsluitend uit intercellulair vocht. Gedurende het bederf komt dan geleidelijk aan meer intracellulair vocht in het sap terecht.

Uit figuur 21 volgt dat op geen enkel ogenblik, ook tijdens de eerste dagen van de bewaarperiode niet, ureum in het intercellulair vocht ontbrak. De concentratiedaling was daarenboven zeer analoog met deze die in visweefsel werd waargenomen. Voor niet geslachtsrijpe doornhaaien werd een zelfde beeld bekomen.

Deze proef wijst er dan ook op dat er een relatief snelle uitwisseling van ureum tussen het intra- en het intercellulair vocht moet geschieden.

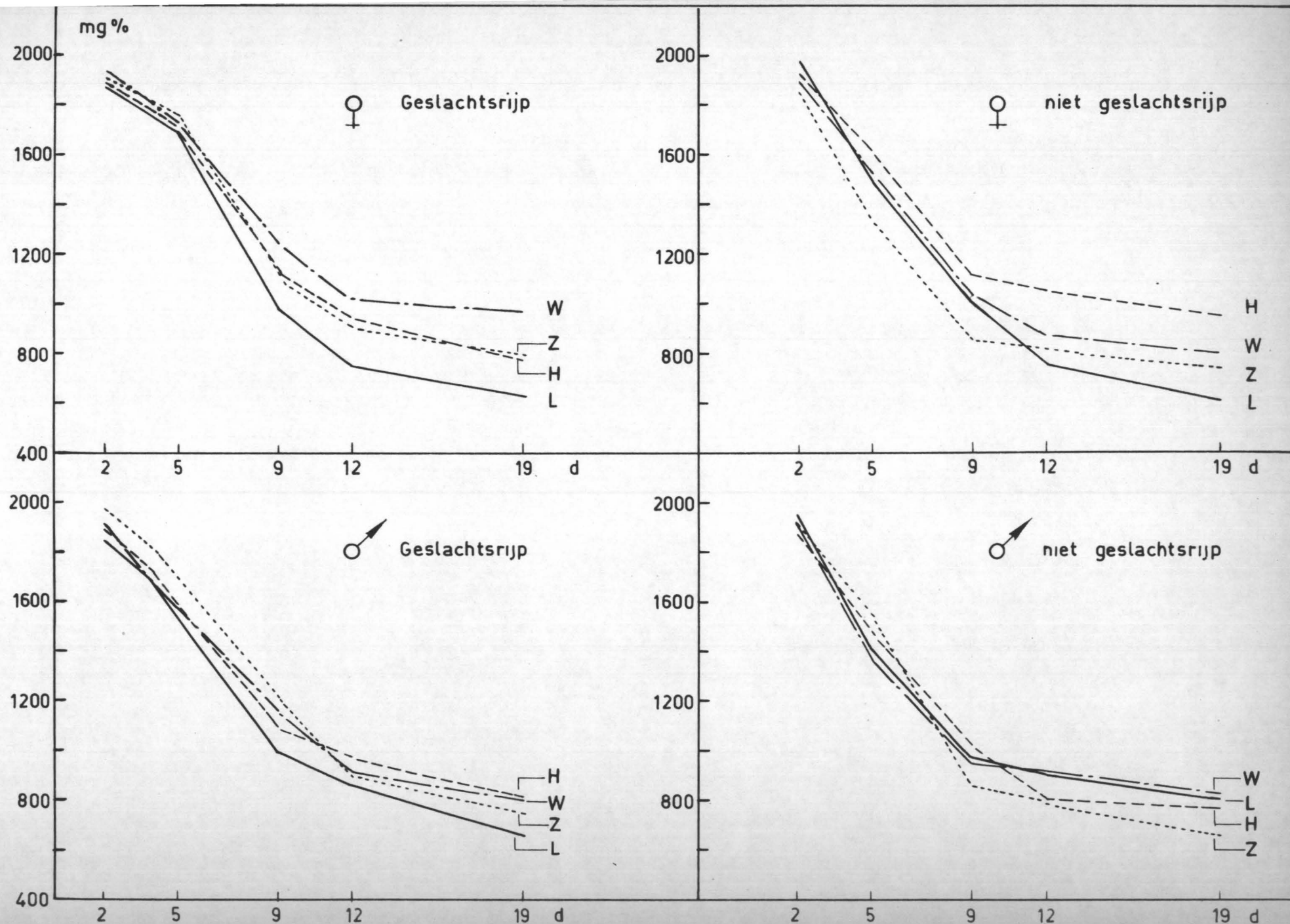


Fig. 22 - Verloop van ureum in *S. acanthias* tijdens het bewaren

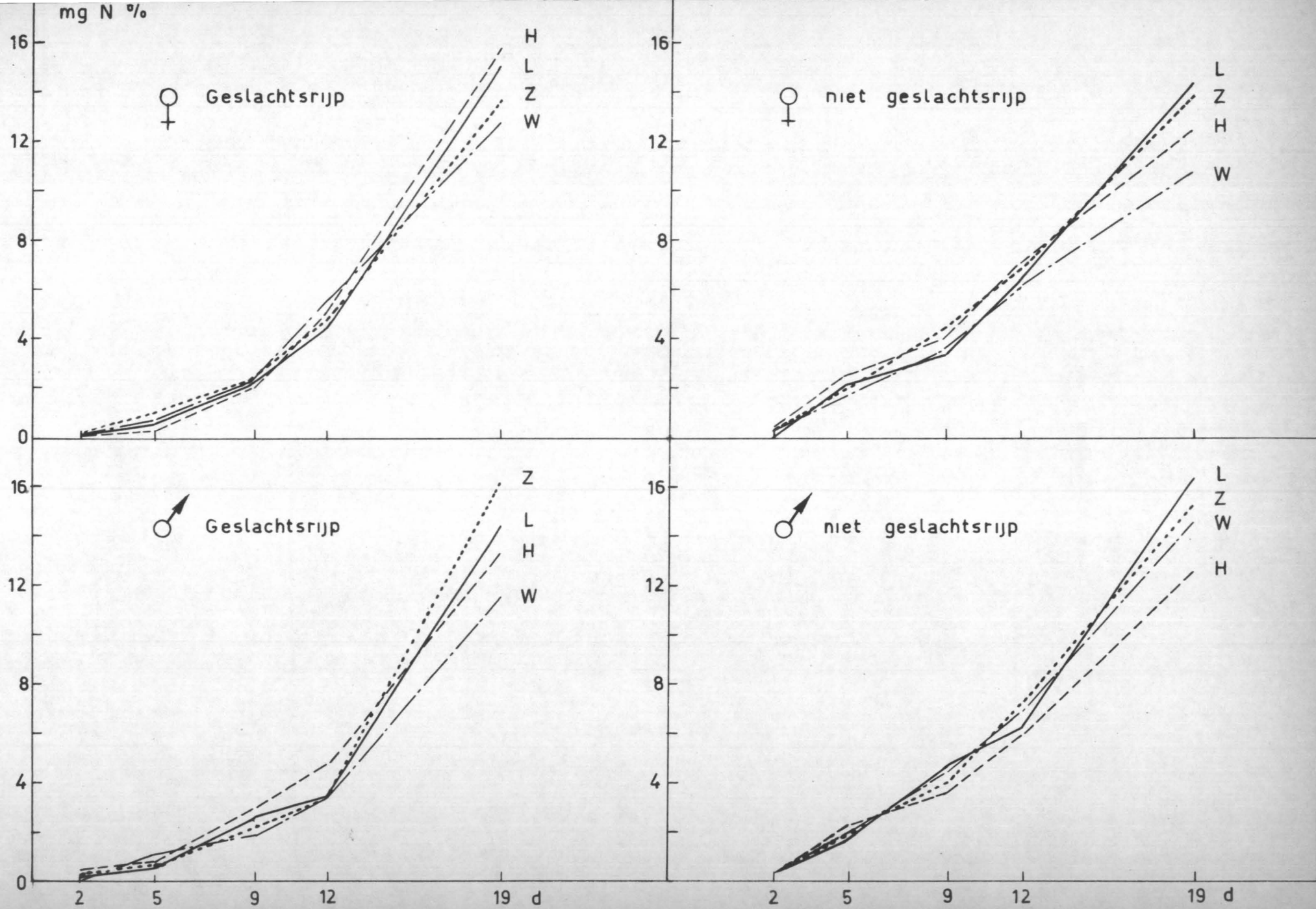


Fig. 23 — Verloop van TMA in *S. acanthias* tijdens het bewaren

Er kan er aan toegevoegd worden dat ook TMAO en α -aminostikstof in perssap hetzelfde beeld gaven. Ook de pH van het sap bleek weinig van dit van het visvlees te verschillen.

De extraheerbare stikstofverbindingen blijken dan ook in doornhaai vlug te diffunderen, hetgeen ongetwijfeld de snelle bederfelijkheid van de vis in de hand werkt.

4.2.2.2. Ureum (figuur 22, tabel A31).

Tot de negende dag blijkt bij de vier diergroepen een vlugge daling van de ureumkoncentratie plaats te vinden, die geenszins met de gevonden ammoniakwaarden overeenkomt (tabel A30, figuur 20), maar wel met de gegevens van de uitloogproef. Deze vaststelling werd ook tijdens de volgende bepalingen verricht : hieruit blijkt dat de ureumkoncentratie in de eerste plaats bepaald wordt door het uitloogeffekt en niet door de afbraak tot ammoniak.

4.2.2.3. Trimethylamine (figuur 23, tabel A32).

De eerste vijf dagen is de vorming van TMA zeer gering, om dan geleidelijk aan belangrijker te worden. De sterkste vermeerdering wordt evenwel tussen de 12de en de 19de dag genoteerd, nl. van gemiddeld 4,4 (geslachtsrijp) en 6,6 (niet geslachtsrijp) tot 14 mg N %. Op te merken valt dat juist in deze periode de optimale pH voor het triamineoxydase ligt, nl. 7,2 tot 7,4 (Elliott 1952).

Deze resultaten komen vrij goed met deze van Shewan (1951) overeen met dit verschil dat deze auteur slechts na een tiental dagen een duidelijke stijging van het TMA-gehalte vaststelde. Zijn vooropstelling dat ammoniak in doornhaai vlugger en in sterkere mate dan TMA gevormd wordt kan hier dan ook niet aanvaard worden.

Opmerkenswaardig is echter dat de waarnemingen van Moyer et al. (1959), Southcott et al. (1960) en Stansby et al. (1968) - de enige die verder in de literatuur over doornhaai voorkomen - op een slechts geringe stijging van het gehalte aan TMA bij de Noord-Amerikaanse doornhaai wijzen, dat na twee weken slechts 2 à 5 mg N % bedroeg. Zoals in 4.2.2.1. vermeld, stelden deze auteurs trouwens hetzelfde feit bij de vorming van ammoniak vast. Tijdens onze proeven werd in twee gevallen, nl. voor ♂ geslachtsrijp, proef 1, winter en voor ♀ niet geslachtsrijp, proef 1, winter, een analoog verschijnsel vastgesteld, waarbij na 19 dagen respektievelijk slechts 2,5 en 2,6 mg N % TMA werden genoteerd (tabel A32).

De reden voor deze slechts geringe TMA-vorming kan bacterieel of enzymatisch zijn. Een tekort aan substraat (TMAO) of aan waterstofdonor (melkzuur, koolhydraten) is a priori uitgesloten. Castell en Snow (1949) stelden vast dat het enzymensysteem dat het TMAO reduceert gevoelig is aan pH-veranderingen. Uit tabel A39 volgt echter dat dit voor de twee proeven het geval niet was. Dezelfde auteurs (1951) stelden verder vast dat ook de temperatuur de reductie beïnvloedt: een daling van enkele graden vermindert gevoelig de triamineoxydase-activiteit. Vanaf de vangst werden de vissen echter telkens op dezelfde wijze in smeltend ijs bewaard, zodat deze faktor evenmin een rol kan spelen.

De aanwezigheid van bepaalde inhibitoren is evenmin waarschijnlijk. Inderdaad, Neilands (1945) bestudeerde de invloed van een ganse reeks natuurlijk en kunstmatige inhibitoren, en stelde vast dat slechts weinig natuurlijke verbindingen een doeltreffende werking vertonen. Enkel indol, skatol en waterstofsulfide inhibeerden gedeeltelijk het enzym. Daar deze verbindingen echter slechts op het einde van de bewaarperiode voorkomen, nl. bij vis die praktisch bedorven is, kan dit de twee afwijkende proeven niet beïnvloed hebben.

Zoals door Moyer et al. (1959) gesuggereerd, ligt de oorzaak waarschijnlijk in een toevallige afwezigheid of slechts gering voorkomen van een triamineoxydase-vormende bakterieflora. Een aanduiding hiervoor is ook dat er tussen de diverse mariene bakteriesoorten een sterk verschil in het vermogen om TMAO te reduceren bestaat. Het percent bakteriën dat triamineoxydase produceert kan aanzienlijk variëren : Dyer (1947) vond 10 à 29 %, terwijl Shewan (1951) cijfers van 8 à 43 % opgeeft.

Men stelt verder vast dat bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien het TMA-gehalte van de 5de tot de 12de dag vlugger oploopt dan bij geslachtsrijpe vissen. De 19de dag echter worden ongeveer dezelfde hoeveelheden aangetroffen. Er blijkt aldus vanaf de 12de dag een duidelijke remming van de TMA-vorming voor te komen. Een stimulering van de TMA-vorming bij de geslachtsrijpe doornhaaien is daarbij minder waarschijnlijk.

Elliott (1952) bewees immers dat een stijging van de pH de reductie van TMAO sterk vermindert en zelfs volledig kan stopzetten. Hij gaf evenwel op dat het verschijnsel vooral vanaf pH 9 merkbaar was. Uit onze proeven blijkt echter dat de remming van de TMA-vorming reeds bij een lagere pH moet gebeuren. Dit verschil kan wellicht verklaard worden door het feit dat Elliott op modelsystemen (gemalen vis, gebufterd midden, geen uitloging) werkte, en dat de waarden in gehele doornhaai die in ijs bewaard wordt, lager komen te liggen. Men kan aannemen dat eenmaal de optimale pH (7,2 à 7,4) voorbij, de aktiviteit van het triamineoxydase sterk daalt.

Een bijkomende inhiberende werking van waterstofsulfide (zie tabel 12) is evenwel niet uitgesloten (Neilands 1945).

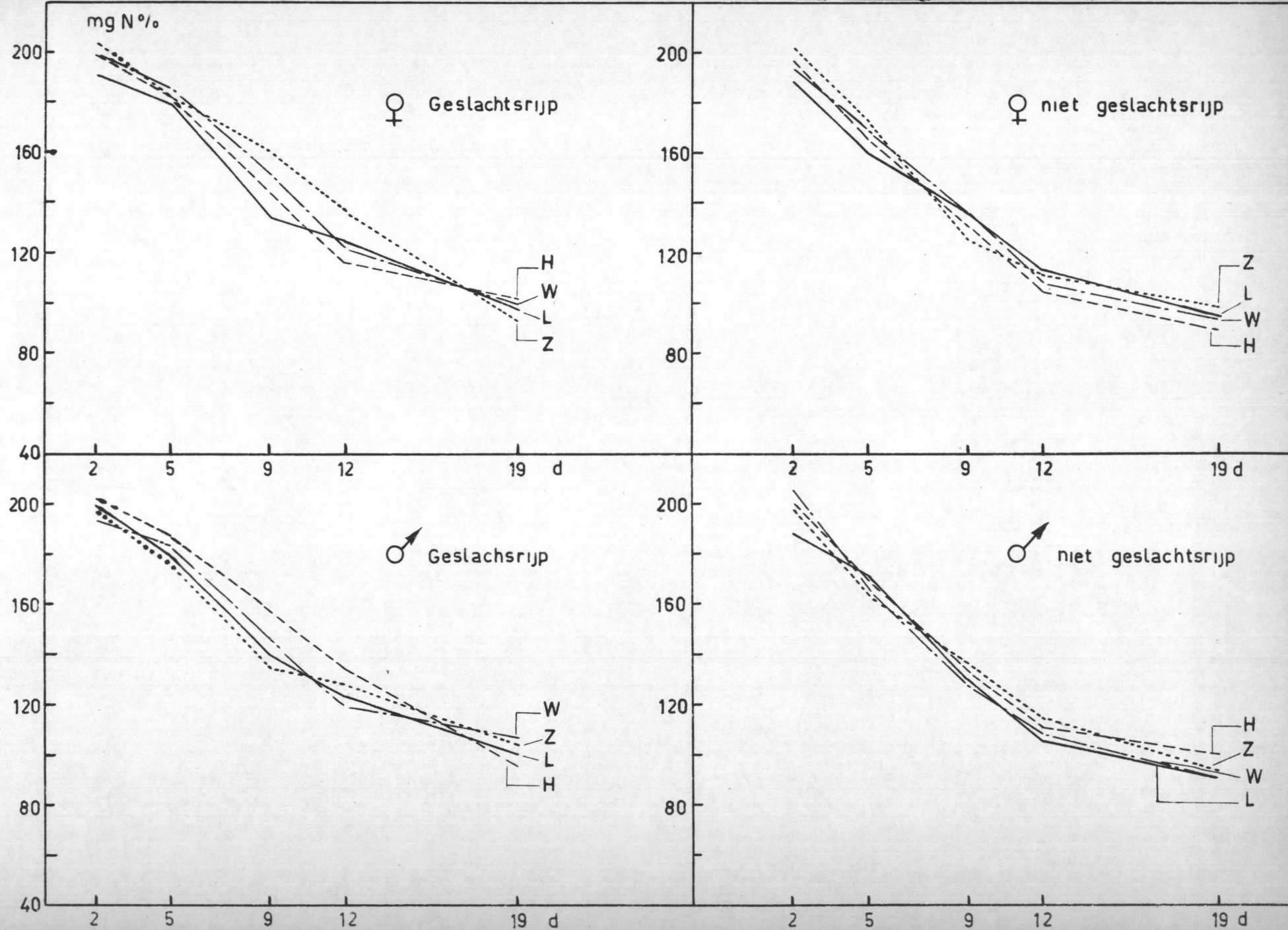


Fig.24—Verloop van TMAO in *S. acanthias* tijdens het bewaren

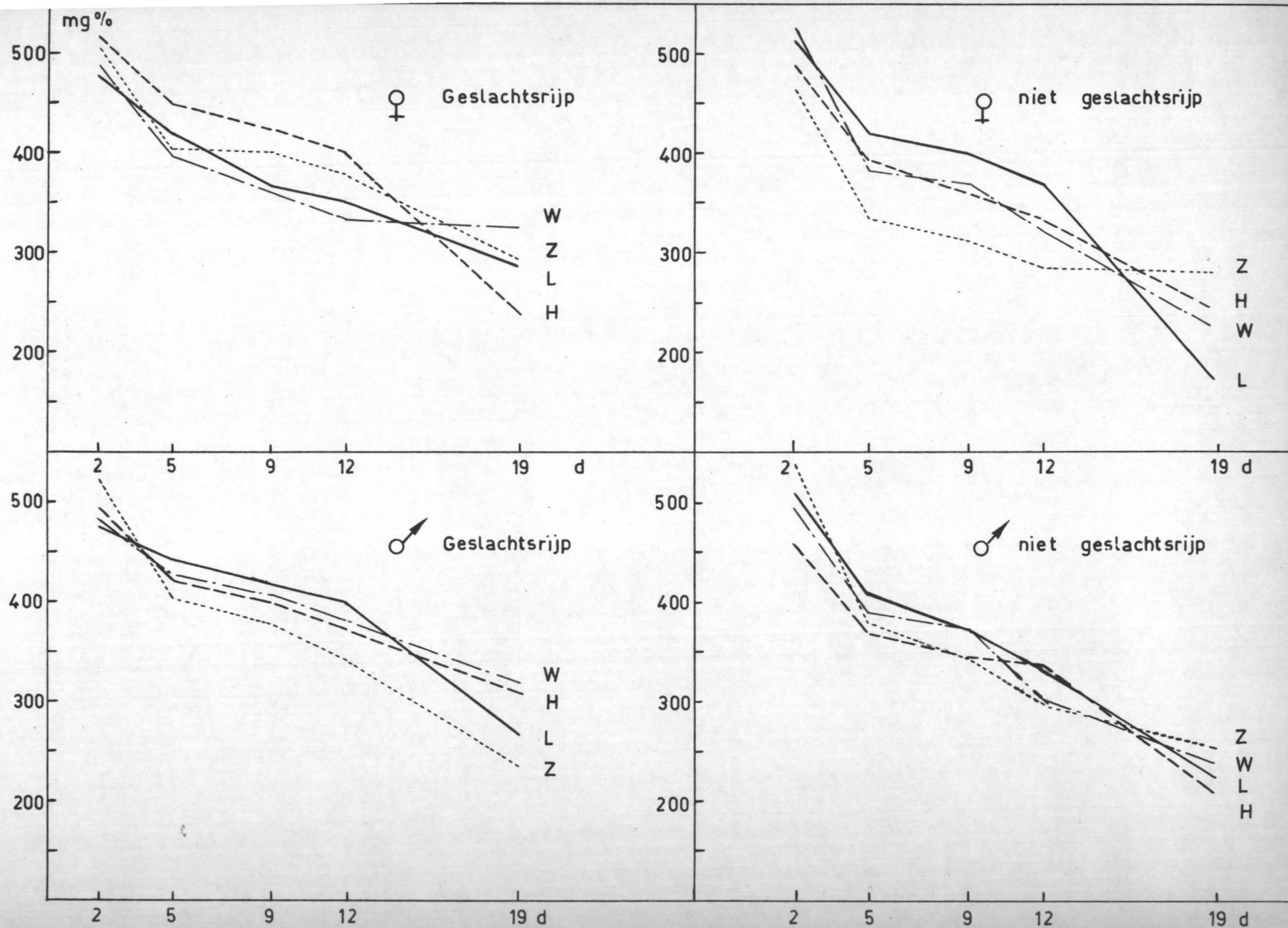


Fig. 25 - Verloop van creatine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

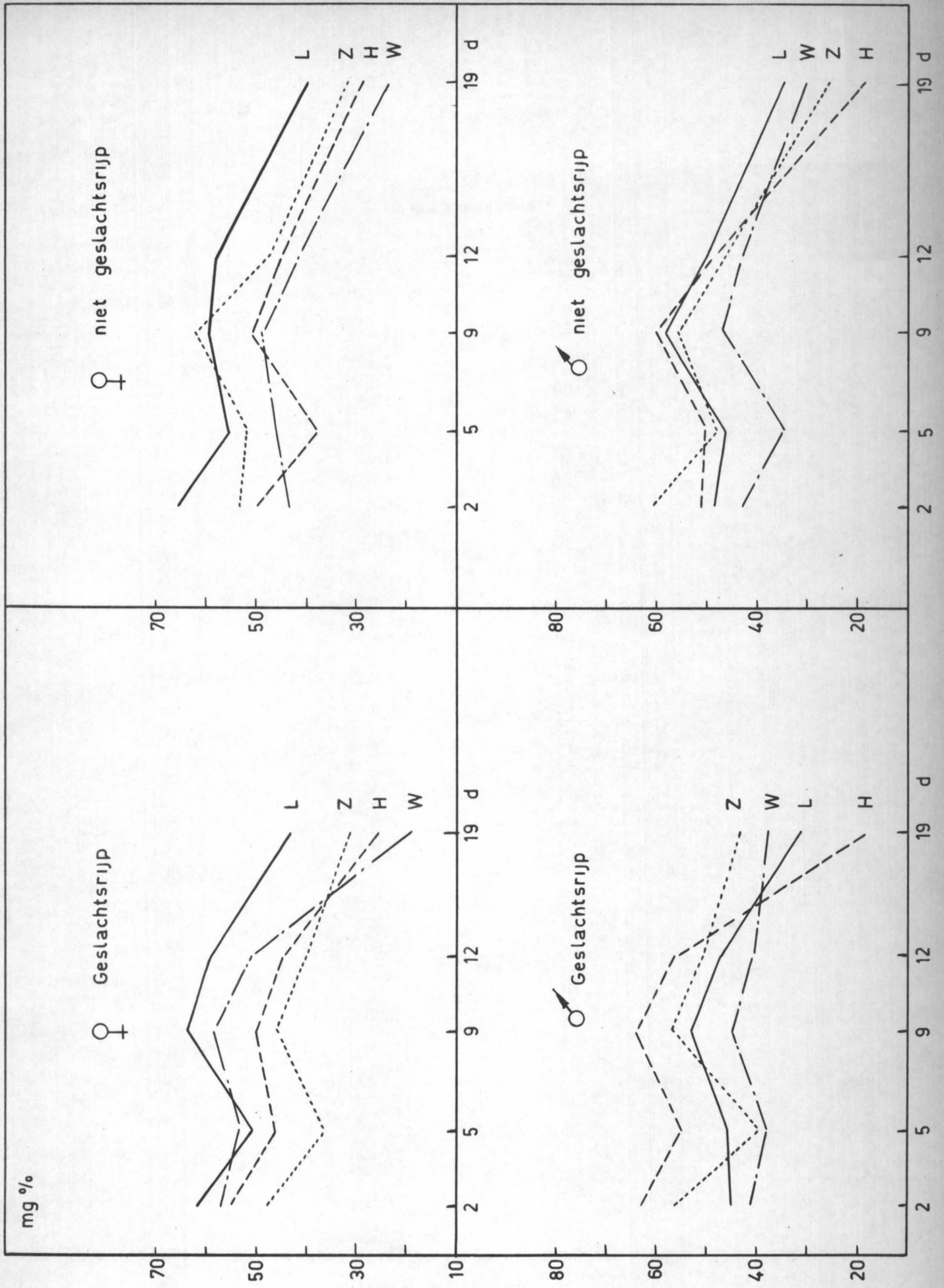


Fig. 26 — Verloop van creatinine in *Sacanthias* tijdens het bewaren

4.2.2.4. Trimethylamineoxyde (figuur 24, tabel A33).

Wanneer men de TMA- en TMAO-waarden vergelijkt, blijkt dat de relatief sterke vermindering van het TMAO-gehalte in de eerste plaats aan het uitlogen van deze stikstofbase te wijten is. Dit wordt trouwens door twee feiten bevestigd. Eerst en vooral daalt tijdens de twee proeven waar slechts weinig TMA gevormd werd (σ^{\uparrow} geslachtsrijp, proef 1, winter en σ^+ niet geslachtsrijp, proef 1, winter) het TMAO-gehalte niettemin ongeveer in dezelfde verhoudingen als voor de andere proeven. Vervolgens wijzen de resultaten van de uitloogproeven (zie 4.2.1.) hier eveneens op.

Zoals voor ureum wordt het TMAO-gehalte in doornhaai tijdens het bewaren in ijs aldus in de eerste plaats door het spoeeffect bepaald.

4.2.2.5. Creatine en creatinine (figuren 25 en 26, tabellen A34 en A35)

Het creatine-gehalte daalt vanaf het begin van de bewaarperiode bij de vier viskategorieën en dit hoofdzakelijk door uitlogen, zoals uit 4.2.1. blijkt. Bij de kleine, niet geslachtsrijpe doornhaaien echter is de concentratievermindering om aangehaalde reden sterker. Tussen de 5de en de 12de dag is de daling minder uitgesproken. Zoals uit figuur 26 blijkt moet het creatine in deze periode gedeeltelijk althans in creatinine worden omgezet. Het is inderdaad uitgemaakt dat creatinine enkel uit creatine kan gevormd worden (Leuthardt 1963).

Vanaf de 12de dag treedt een scherpe concentratievermindering op. Daar uit de uitloogproeven (zie 4.2.1.) blijkt dat tussen de 12de en de 19de dag nog maar weinig creatine in het ijssmeltwater terecht komt, moet hier een duidelijk biochemische afbraak plaatsgrijpen. Alhoewel uit deze proeven niet kon uitgemaakt worden welke verbindingen vrijkomen, kan men aannemen dat creatine hier vooral gedesamineerd

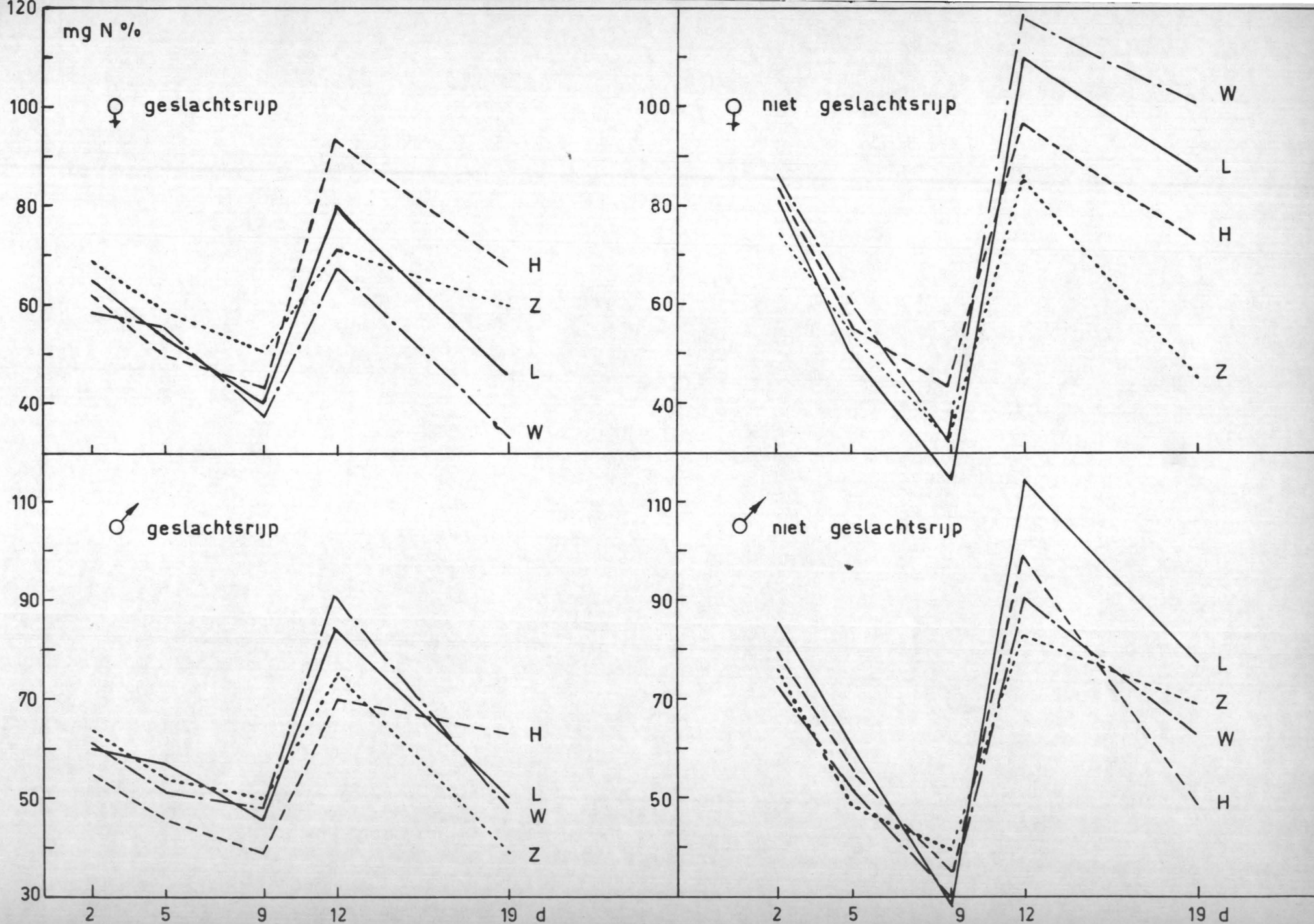


Fig. 27 - Verloop van α -amino-stikstof in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

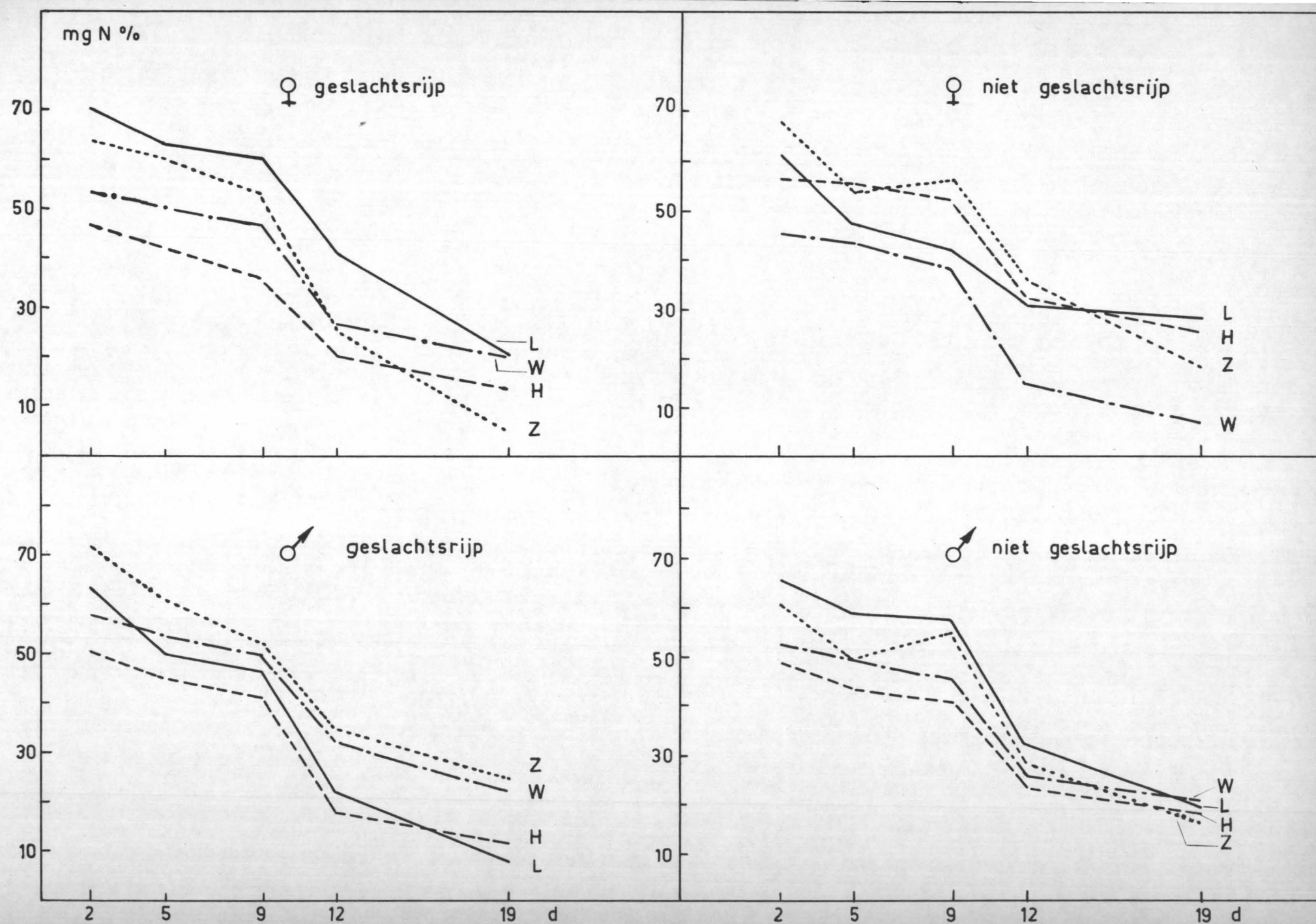


Fig. 28-Verloop van de peptiden in *Sacanthias* tijdens het bewaren

wordt. Shewan (1961) stelde immers deze afbraak bij kabeljauw vast.

Bij de niet geslachtsrijpe dieren worden lagere waarden bereikt, maar de relatieve concentratievermindering is ongeveer gelijk vanaf de 5de dag, nl. ± 50 mg %. Dit wijst erop dat in geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe dieren de afbraakreacties een snelheid van dezelfde grootte-orde hebben.

Bij creatinine wordt eerst een daling waargenomen die ongetwijfeld aan het uitloogeffekt (zie 4.2.1.) te wijten is. Van de 5de tot de 9de dag treedt een concentratieverhoging op ; zoals boven reeds aangegeven wijst dit erop dat een hoeveelheid creatine in creatinine wordt omgezet. Vanaf de 9de dag grijpt een nieuwe daling plaats. Zoals creatine, moet tijdens deze periode ook creatinine biochemisch afgebroken worden.

4.2.2.6. α -amino- en peptidenstikstof (figuren 27 en 28, tabellen A36 en A37).

Voor de α -aminostikstof blijkt een duidelijk verschil tussen de kurven van de geslachtsrijpe en de niet geslachtsrijpe doornhaaien te bestaan. Voor de vier kategoriën zijn deze kurven afwisselend dalend, stijgend en opnieuw dalend. Bij de niet geslachtsrijpe dieren zijn deze dalingen en stijgingen meer uitgesproken. Zoals in 3.2.2.4. vermeld liggen bij deze vissen ook de uitgangswaarden significant hoger.

Voor het peptidengehalte blijken er tussen de vier categorieën geen duidelijke verschillen op te treden, en de kurven hebben overal een dalend verloop. Opmerkenswaardig is hierbij dat de vastgestelde significante seizoenverschillen tussen de diverse beginwaarden (zie 3.2.2.5.) tijdens de daarop volgende bewaarperiode weinig of geen invloed blijken te hebben. Tussen de negende en de twaalfde dag is de

vermindering van het peptidengehalte het sterkst. Daar tijdens deze periode het uitloggen én van peptiden én van aminozuren sterk gereduceerd is, wijst de stijging van het α -aminogehalte op een exopeptidasenwerking die sterker is dan de endopeptidasenaktiviteit. Ook de afbraakreakties van de aminozuren grijpen minder vlug plaats dan de vorming van nieuwe vrije zuren uit de peptiden. Vanaf de 12de dag gaat de daling van de peptiden minder snel door, zodat hier de aktiviteit van de endopeptidasen deze van de exopeptidasen moet benaderen. Anderzijds blijkt hier de aminozurenafbraak sterker dan de peptiden-splitsing te zijn. De grotere schommelingen die bij het α -aminogehalte van de niet geslachtsrijpe doornhaaien worden vastgesteld, worden echter niet bij de peptiden teruggevonden. Dit wijst erop dat bij deze vissen de endo- en de exopeptidasen een sterkere aktiviteit vertonen zodat zij op hetzelfde peil van de geslachtsrijpe individuen blijven. Voor de endopeptidasen wordt dit door de bepaling van de proteolytische aktiviteit bevestigd (zie 4.2.2.16.).

Een andere indikatie hiervoor wordt door de uitloogproeven gegeven. Inderdaad, alhoewel alle kurven van de vier categorieën doornhaai ongeveer hetzelfde uitzicht vertonen en een verschil tussen kleine en grote vissen niet duidelijk waarneembaar is, hebben de kleine dieren de 5de en de 9de dag sterkere uitloogwaarden, hetgeen erop wijst dat meer peptiden gevormd werden maar door het groter relatief oppervlak sterker uitgespoeld werden.

Bij de kleine vissen is het uitloogeffekt de eerste negen dagen groter. Wanneer men echter voor kleine en grote doornhaaien de gedurende de eerste 5 dagen uitgeloopte hoeveelheid α -aminostikstof vergelijkt met de hoeveelheid die in de vis afnam, dan stelt men vast dat deze laatste hoeveelheid veel meer verschilt dan de uitloogwaarden. Dit betekent dat de afbraak van α -aminostikstof in de kleine vissen vroeger geschiedt en intenser doorgaat. Dezelfde

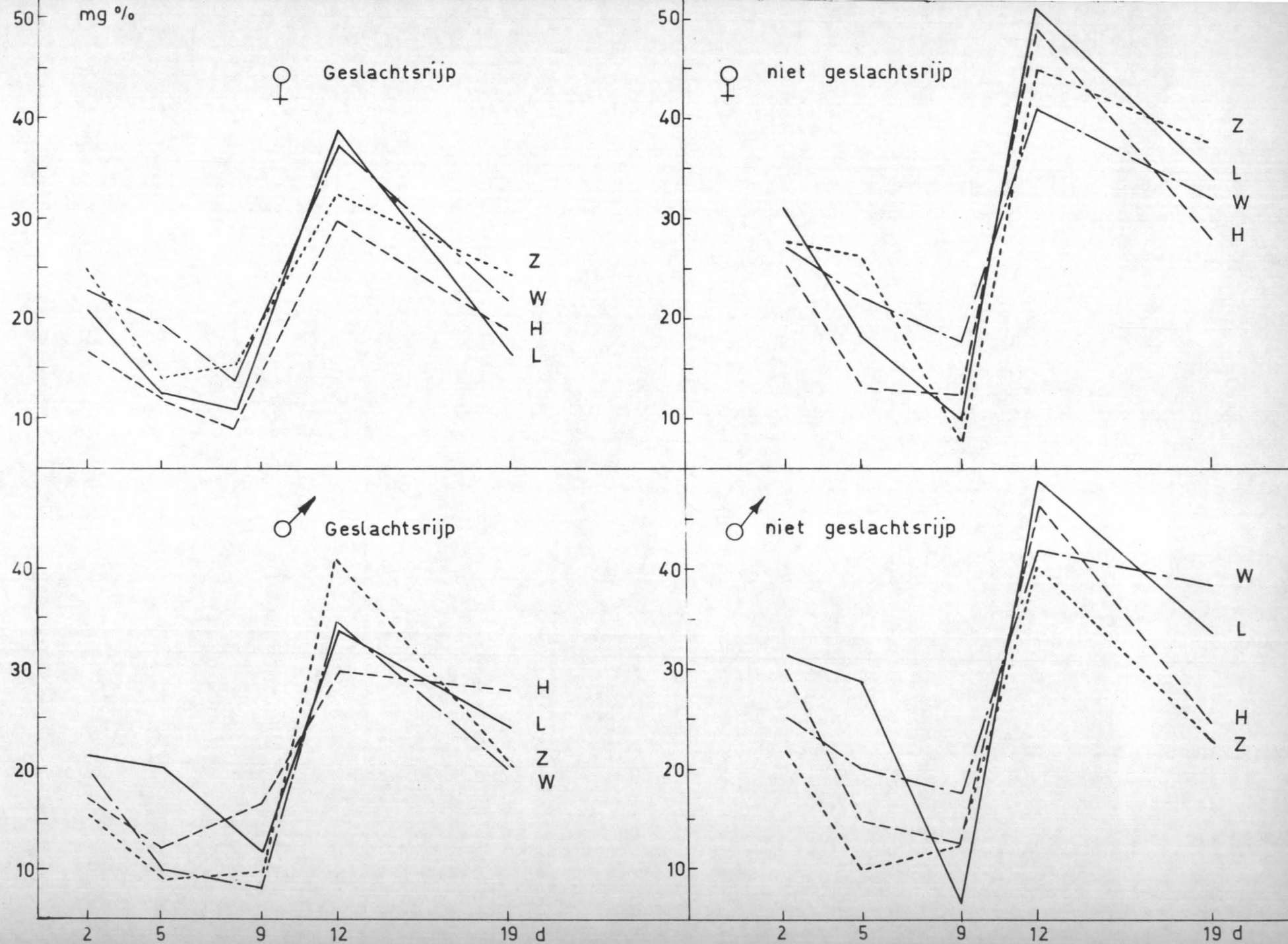


Fig. 29 - Verloop van α -alamine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

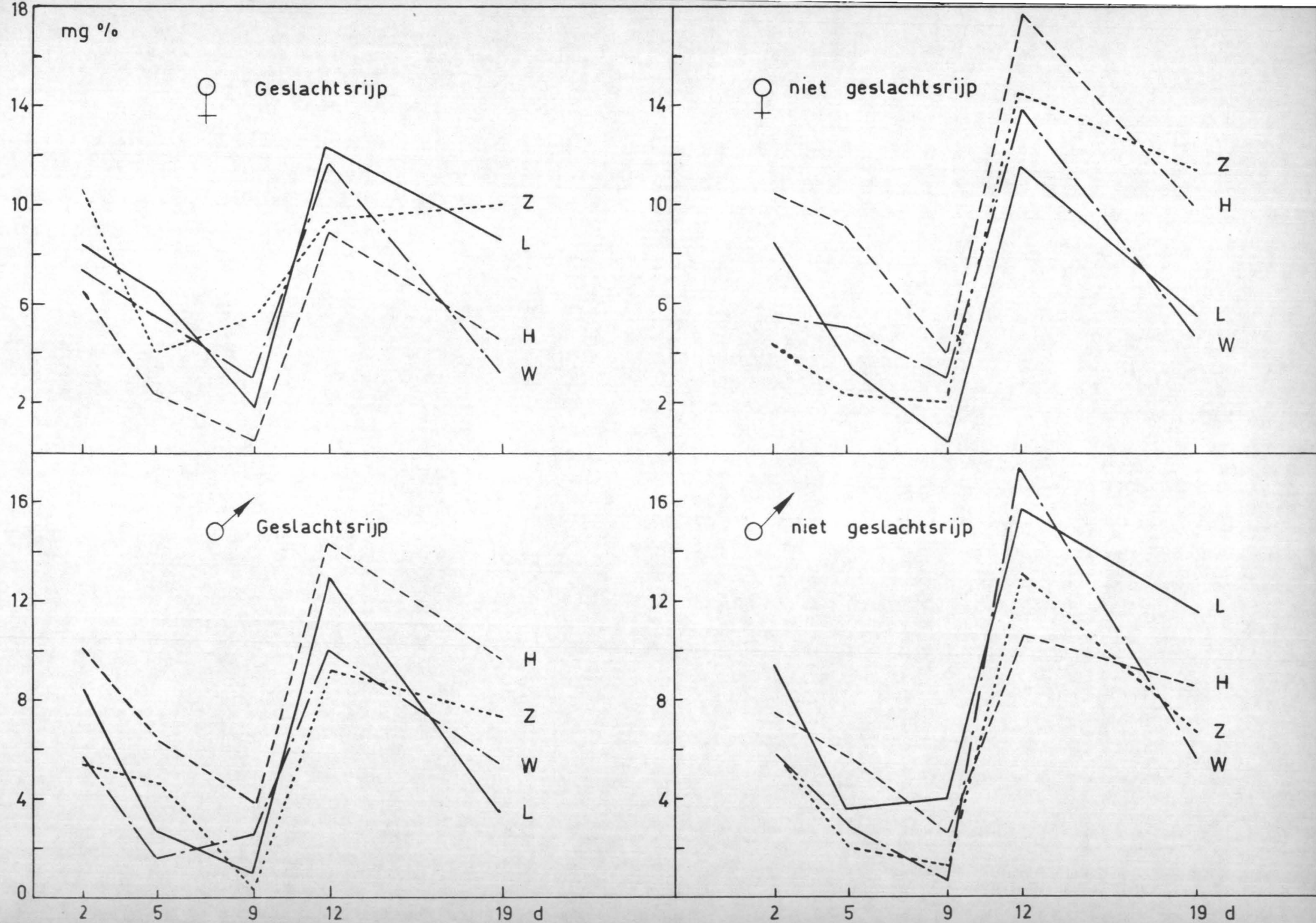


Fig.30 -Verloop van arginine in *S.acanthias* tijdens het bewaren.

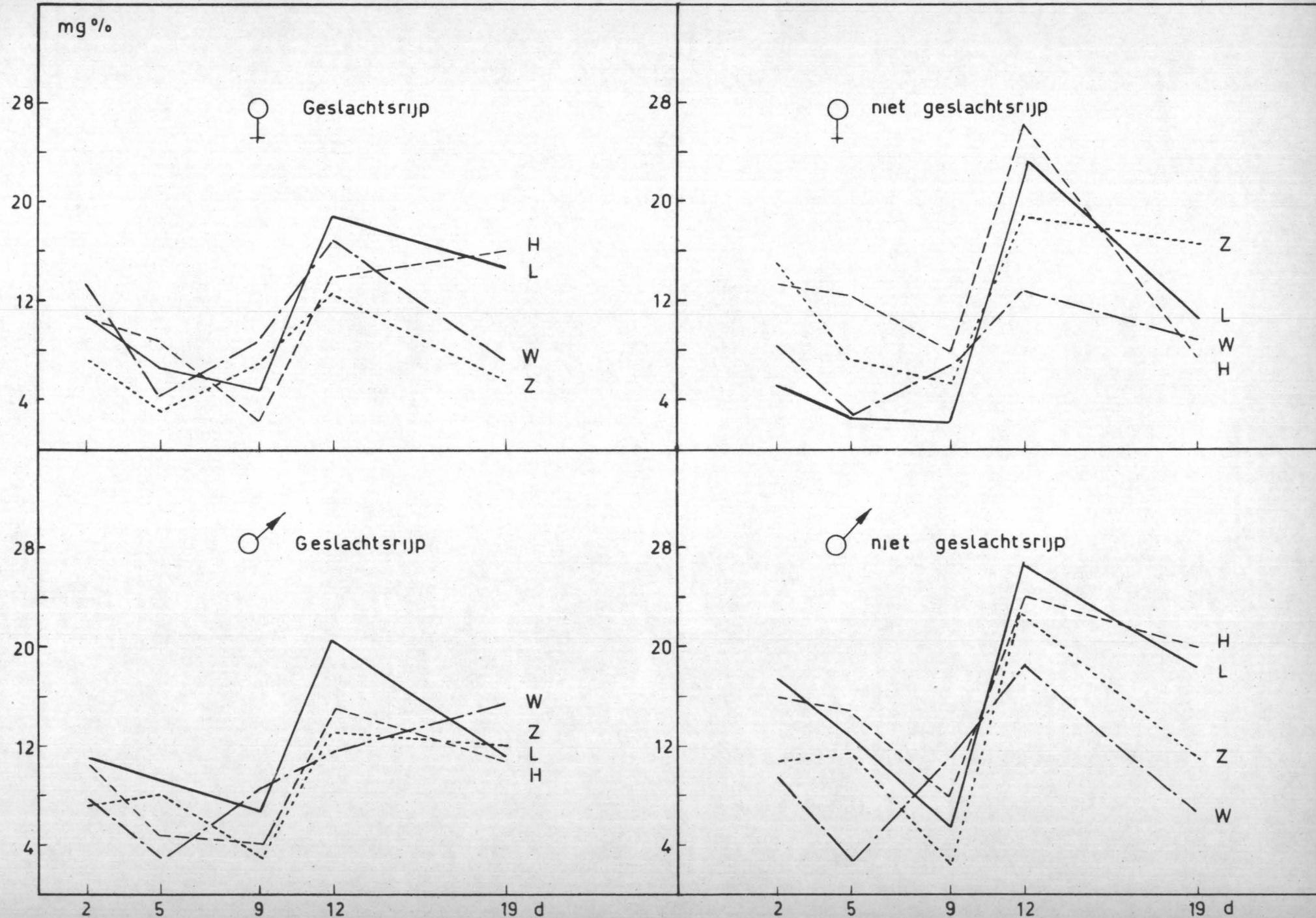


Fig. 31 - Verloop van fenylalamine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

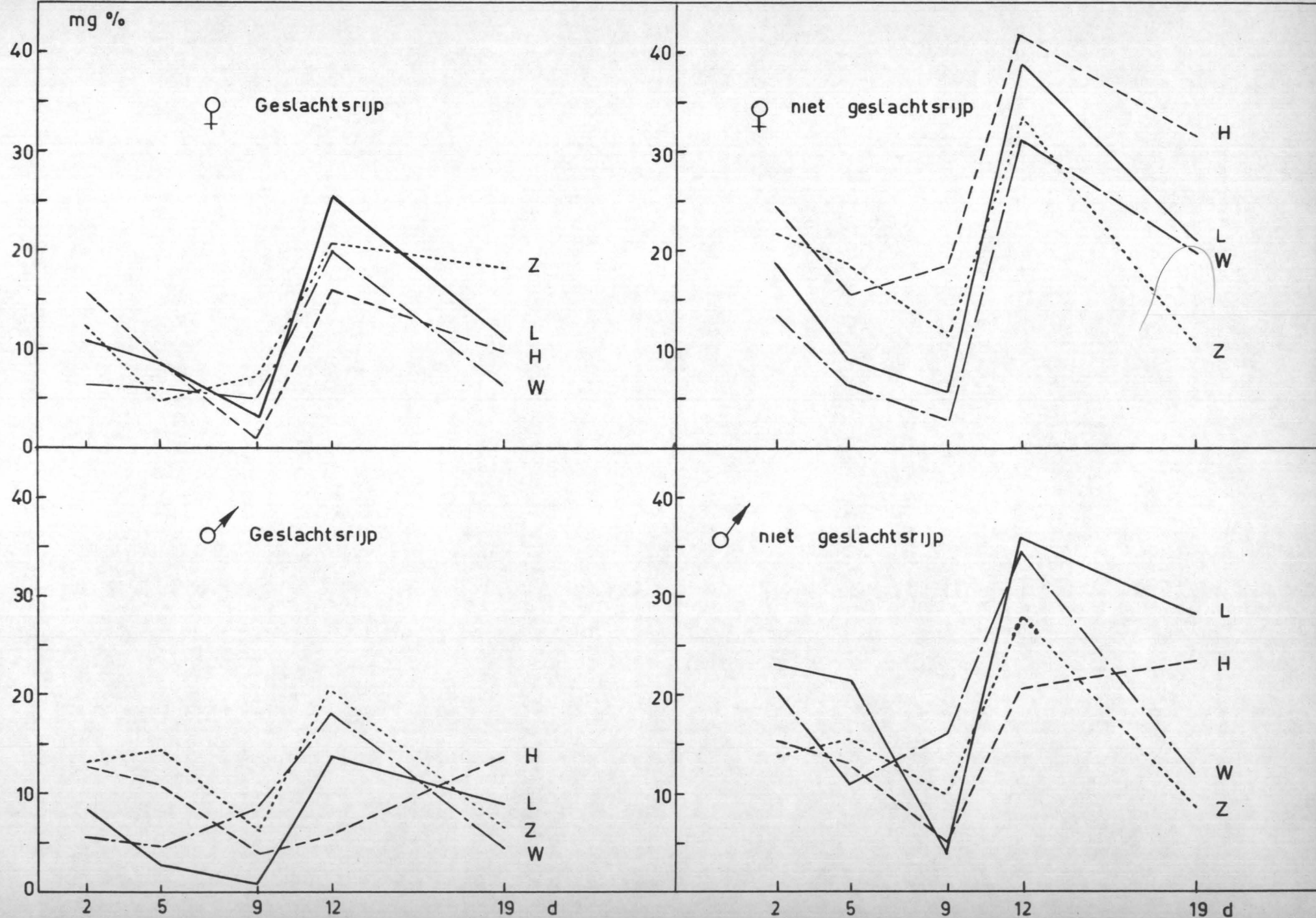


Fig. 32 - Verloop van glutaminezuur in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

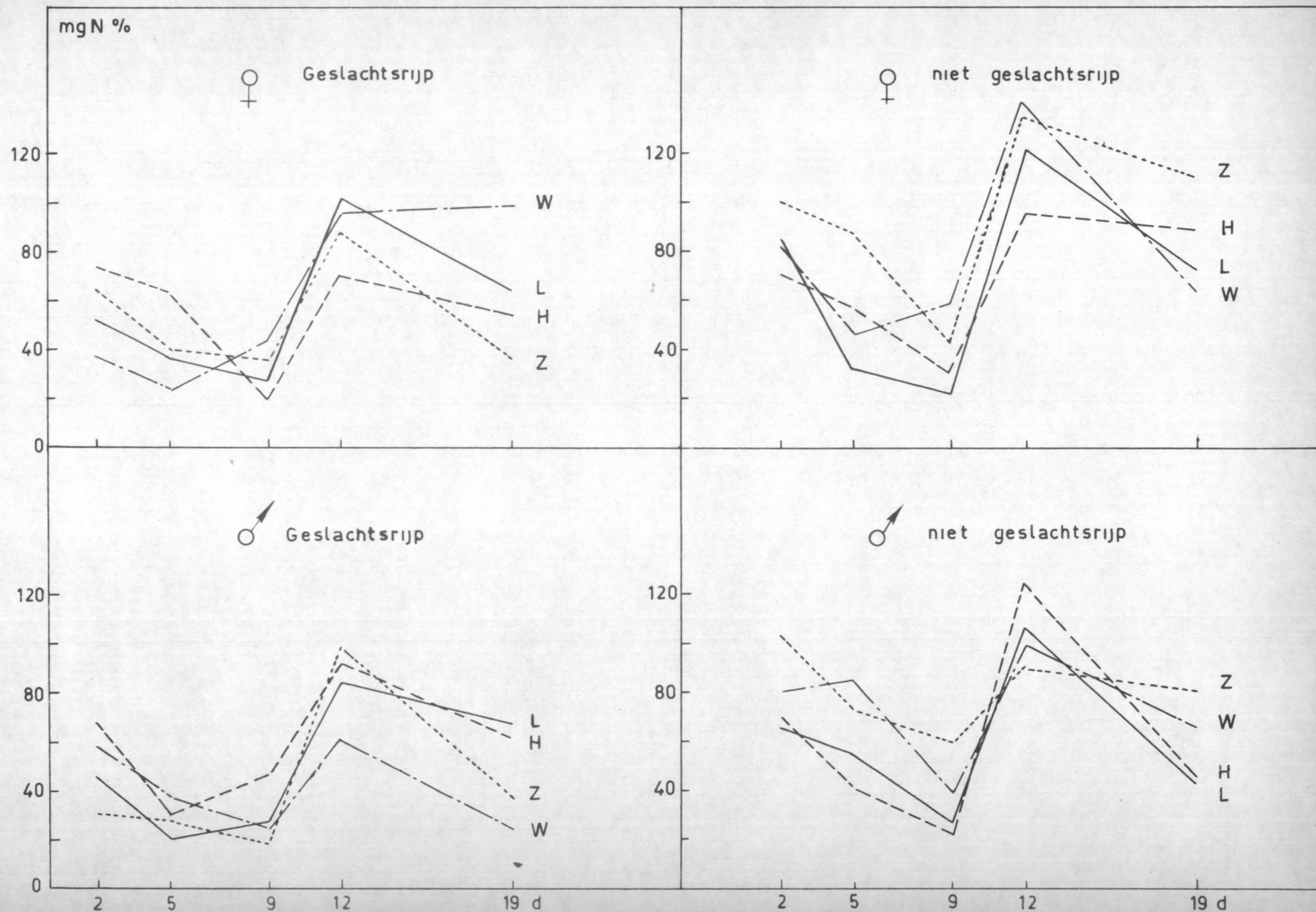


Fig. 33 - Verloop van glycine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

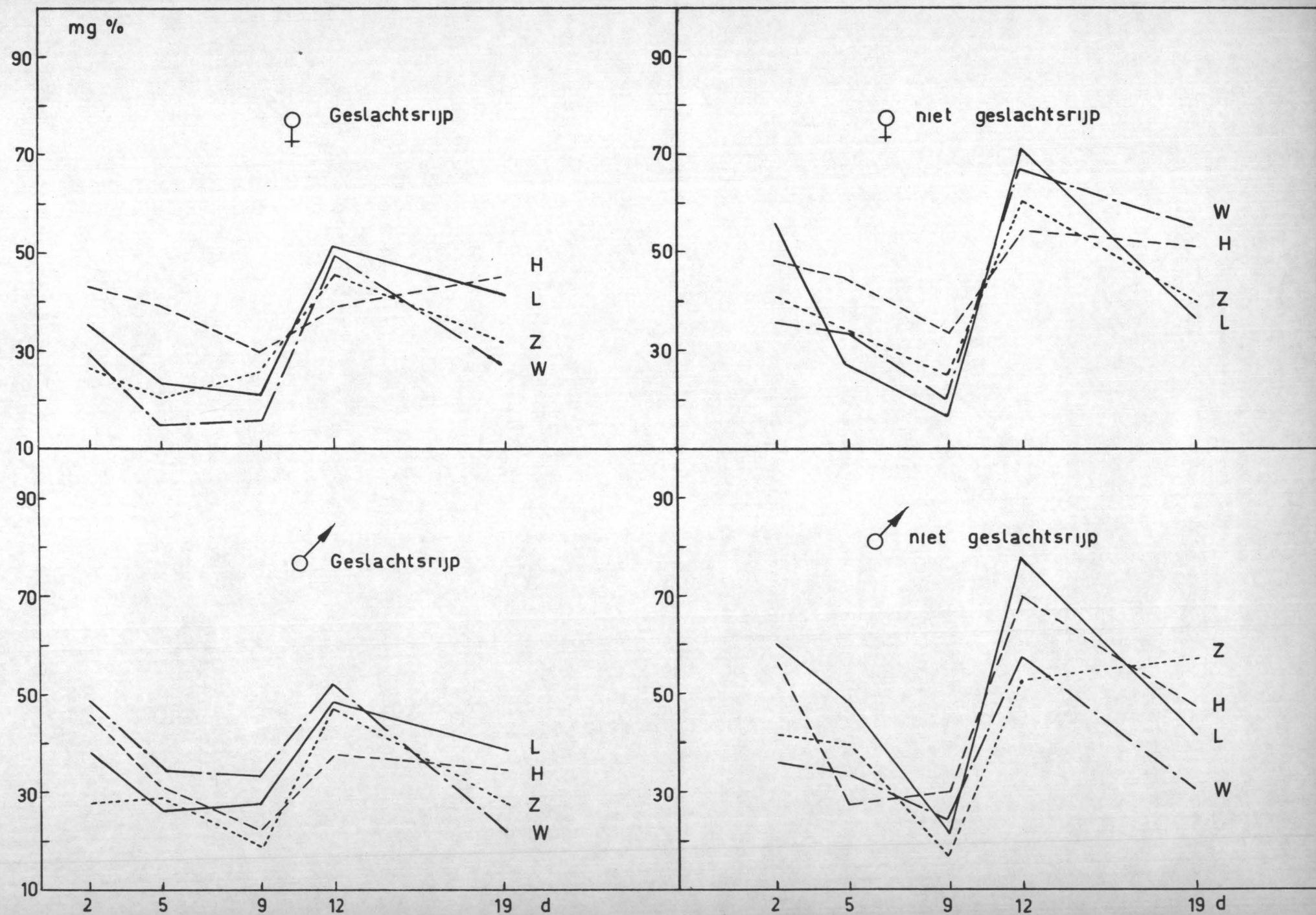


Fig.34 - Verloop van leucine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

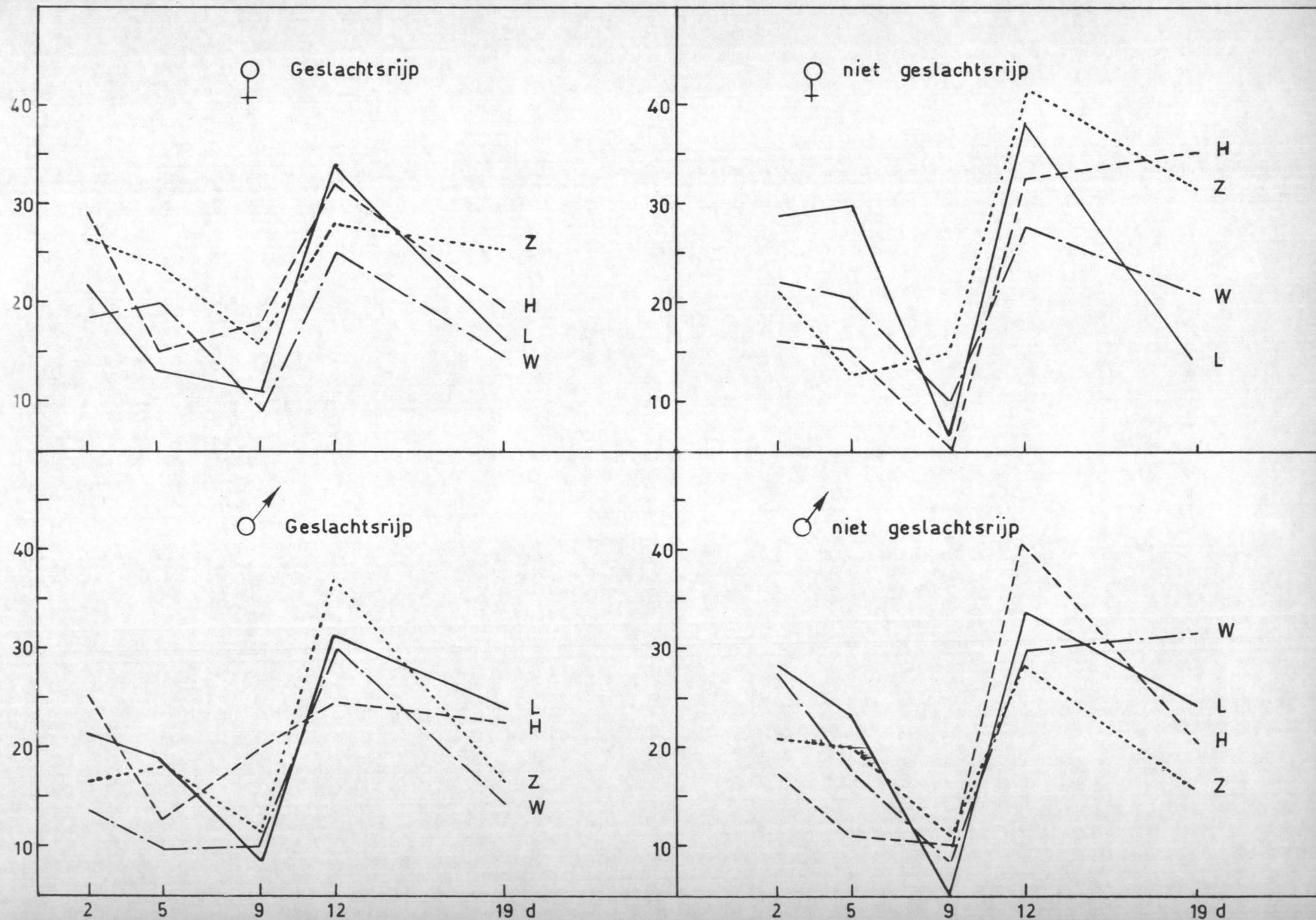


Fig. 35 - Verloop van threonine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

waarneming werd de 9de dag verricht en wordt in 4.2.3. verder besproken.

Het wisselend verloop van het α -aminogehalte is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat de bacterieflora in de loop van het bederf kwalitatief verandert, hetgeen dan op bepaalde tijdstippen een gewijzigde invloed heeft op de respektieve intensiteit van de vormings- en afbraakreacties van de aminozuren. Dit feit werd immers door verschillende auteurs vastgesteld (Castell et al. 1948 ; Shewan 1951). Volgens Ranke (1960) zou de stijging van de pH hierbij determinerend zijn.

Tenslotte kan opgemerkt worden dat bij de doornhaai het seizoen geen invloed op de evolutie van het α -aminogehalte heeft. Dit is in tegenstelling met hetgeen door Ranke (1960) en Bramstedt (1963) voor diverse beenvissen werd vastgesteld, nl. een hoger gehalte aan vrije aminozuren in de zomerperiode.

4.2.2.7. Vrije aminozuren.

Cysteïne, cystine, proline en hydroxyproline worden afzonderlijk besproken.

Uit de resultaten van de overige aminozuren blijkt dat, alhoewel enkele uitzonderingen voorkomen, het gehalte aan α -alanine, arginine, fenylalanine, glutaminezuur, glycine, leucine en threonine (figuren 29 tot 35) een ongeveer sinusoidaal verloop kent, dat vrij goed met de kurven van α -aminostikstof overeenkomt (figuur 27).

Voor de niet geslachtsrijpe doornhaaien worden in de meeste gevallen de 12de dag hogere waarden bereikt, hetgeen eveneens met de α -amino-kurven overeenstemt. De betekenis van deze resultaten werd dan ook reeds in 4.2.2.6. toegelicht. Men kan er aan toevoegen dat de

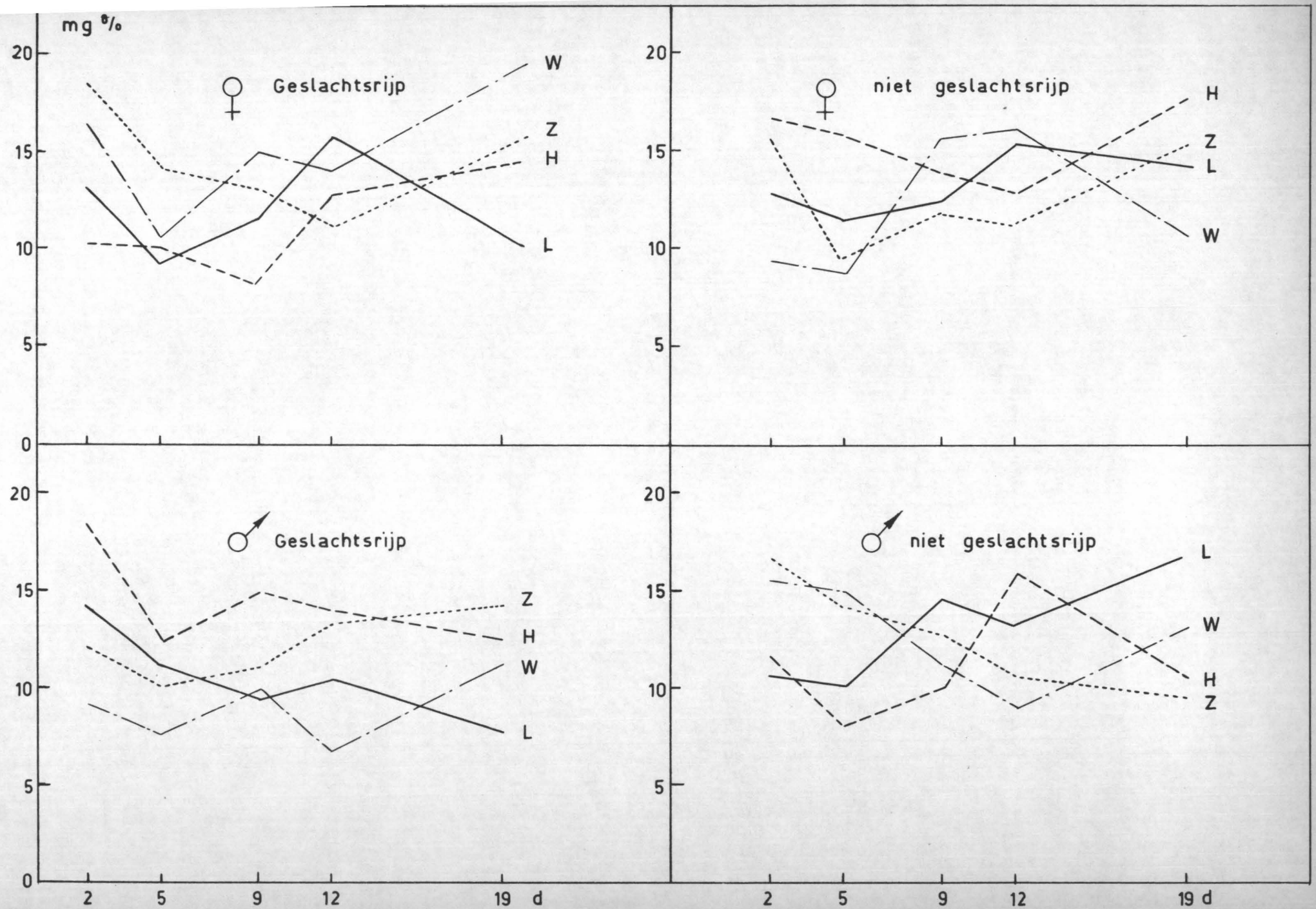


Fig. 36 - Verloop van β -alanine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

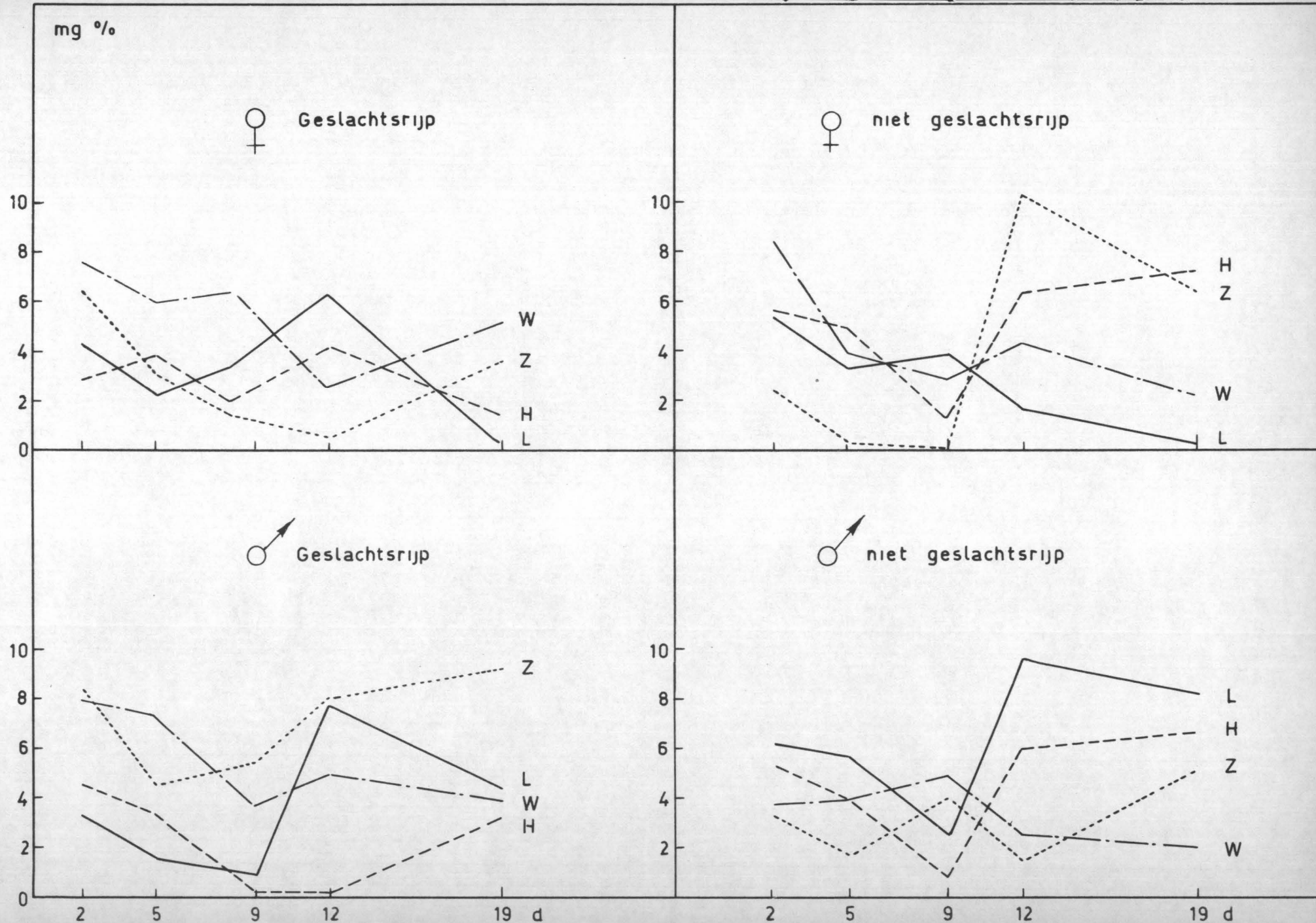


Fig. 37 - Verloop van asparaginezuur in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

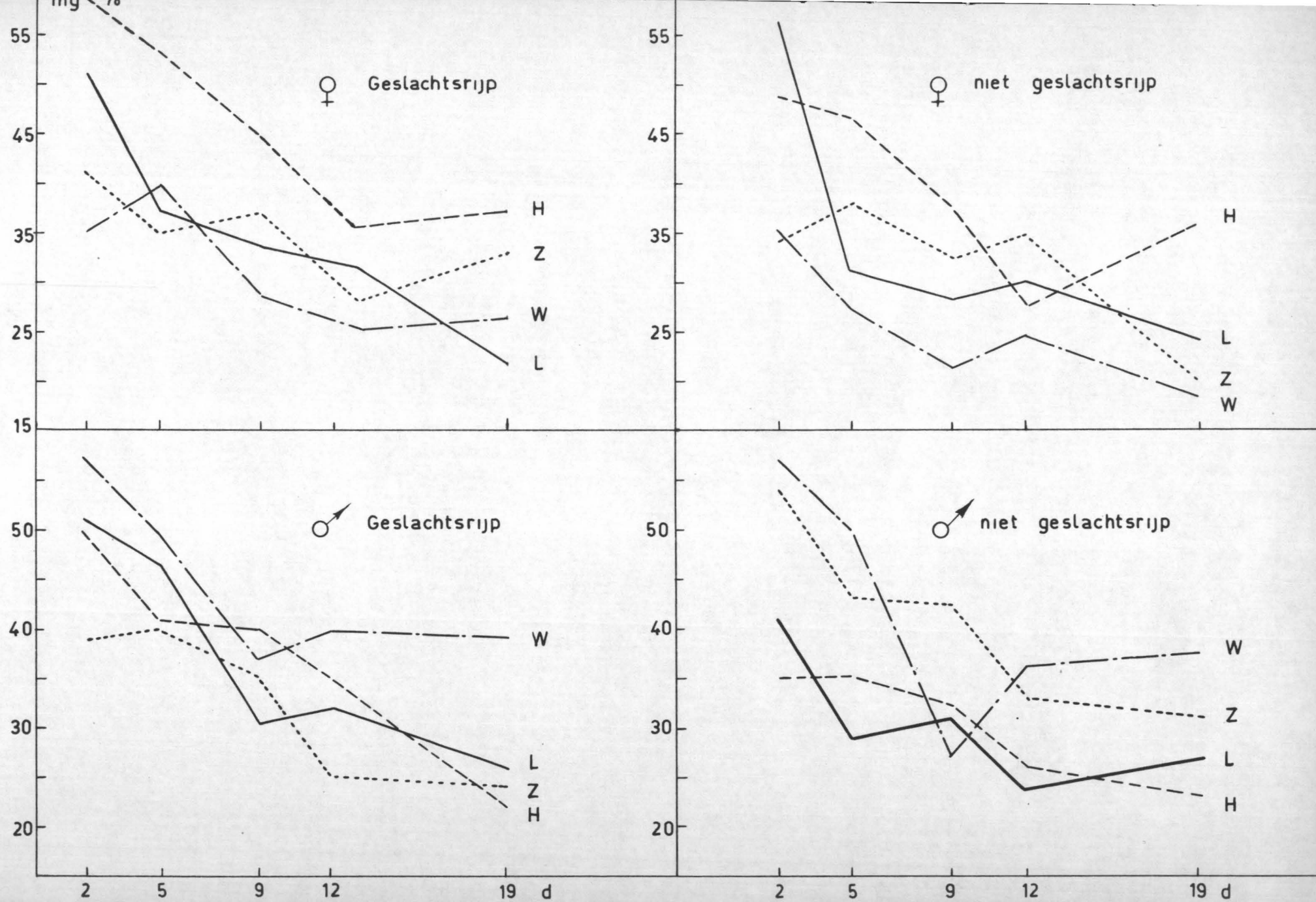


Fig. 38 - Verloop van sarcosine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

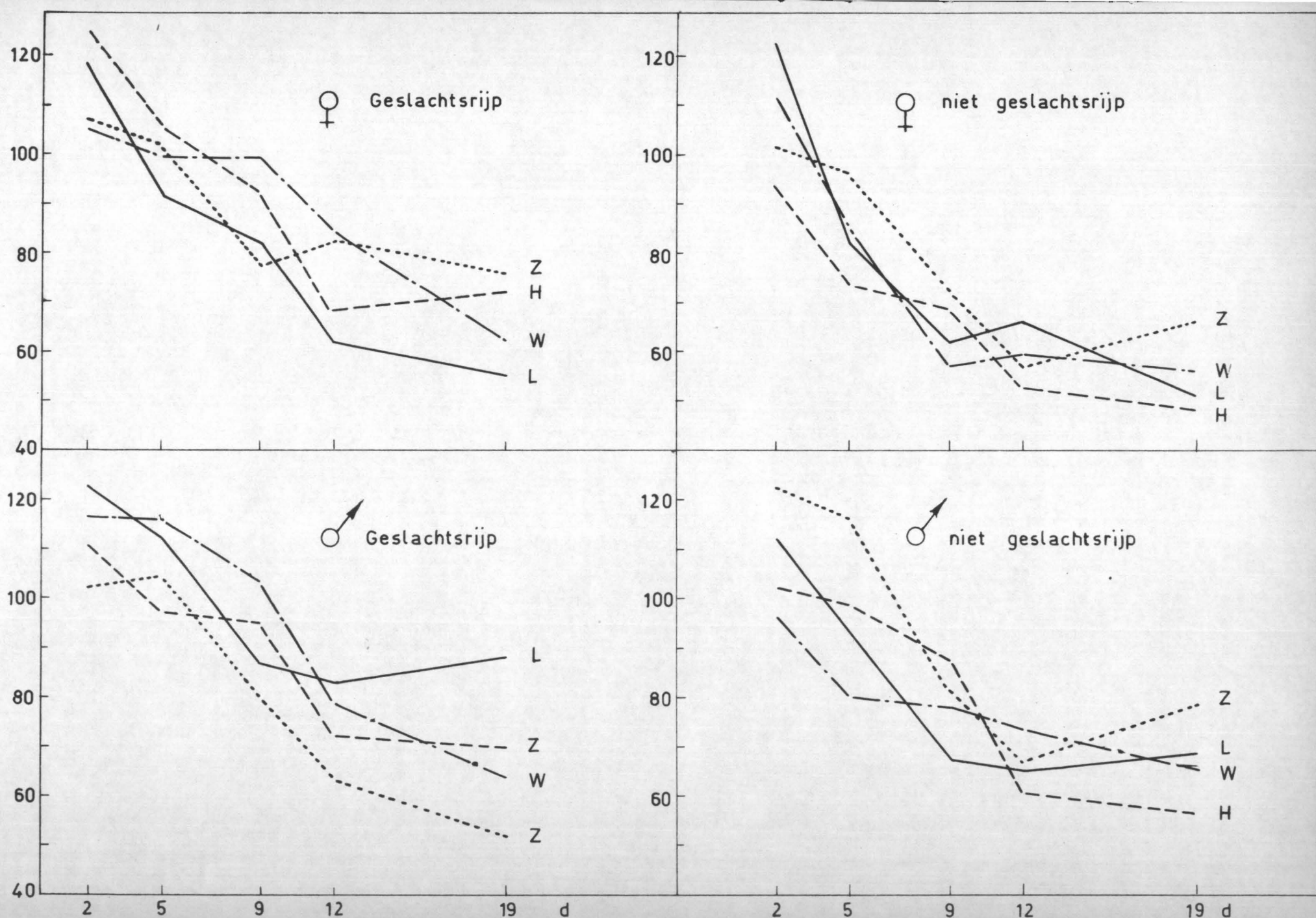


Fig. 39 - Verloop van taurine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

biochemische afbraak- en vormingsreakties die het gehalte aan bovenvermelde aminozuren tijdens het bewaren van *S. acanthias* bepalen, op ongeveer dezelfde manier moeten worden beïnvloed.

Het verloop van β -alanine (figuur 36) en asparaginezuur (figuur 37) is onregelmatig maar wijst eerder op een relatief konstant gehalte. In ieder geval kan worden opgemerkt dat tussen de 2de en de 5de dag, 30 van de 32 kurven een dalend verloop vertonen dat aan het uitlogen en waarschijnlijk ook aan de bakteriële afbraak te wijten is.

Dat er op geen enkel tijdstip een duidelijke stijging van β -alanine wordt vastgesteld kan worden verklaard door het feit dat dit aminozuur in eiwitten ontbreekt, zodat het tijdens de proteolyse hieruit niet kan worden vrijgesteld. Verder ontbreken eveneens de dipeptiden anserine en carnosine, die tijdens het bewaren onder invloed van het anserinase β -alanine kunnen geven (Jones 1955).

Door decarboxylering van asparaginezuur kan het eveneens ontstaan (Siebert et al. 1965). Op te merken valt echter dat Ranke (1955, 1960) en Bramstedt (1962), vaststelden dat tijdens het bewaren van beenvissen een stijging van β -alanine met een daling van het asparaginezuurgehalte gepaard ging, hetgeen hier niet het geval is (figuren 36 en 37).

Pantotheenzuur (bestanddeel van coënzyme A) bevat eveneens β -alanine. Door de zeer geringe concentraties is een eventuele vorming van β -alanine uit dit zuur echter weinig waarschijnlijk.

Sarcosine en taurine, die niet in eiwitten voorkomen, kennen een algemeen dalend verloop (figuren 38 en 39). Deze vermindering is het sterkst de eerste negen dagen, en is ongetwijfeld in deze periode hoofdzakelijk aan het uitlogen te wijten. Men bemerkt hierbij

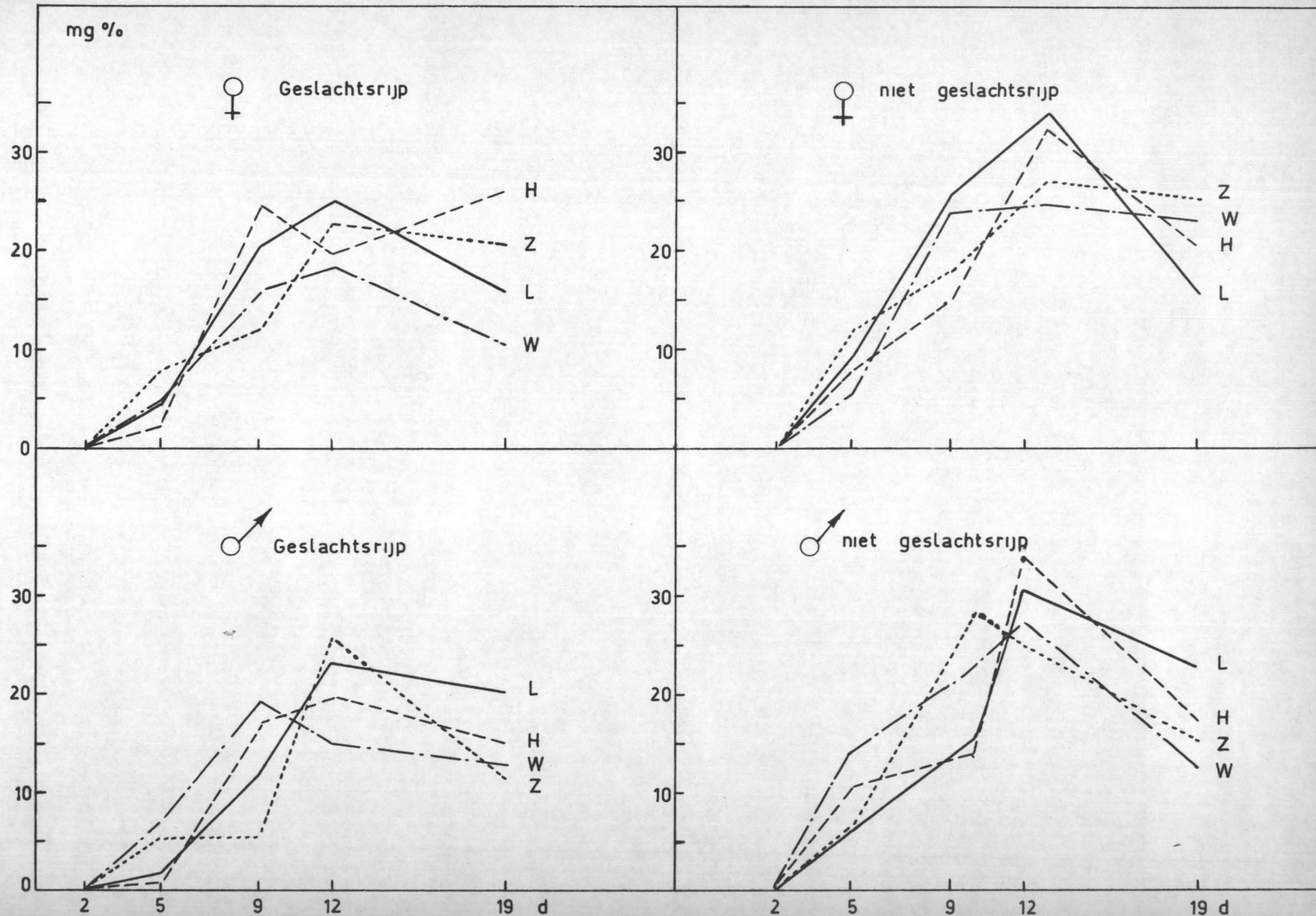


Fig.40 - Verloop van tyrosine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

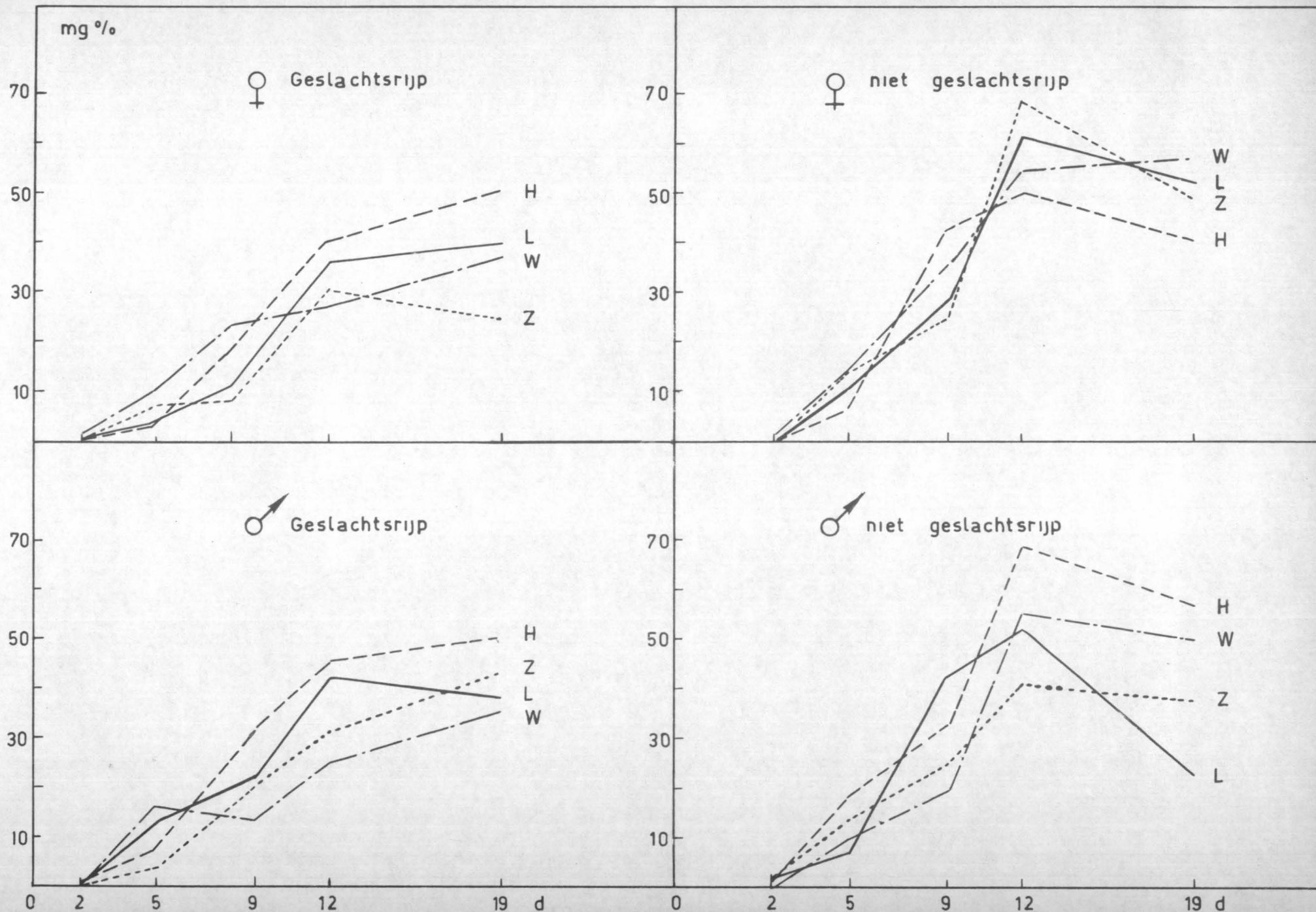


Fig. 41 - Verloop van lysine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

dat de daling bij de niet geslachtsrijpe vissen sterker is, hetgeen hiervoor een bijkomend argument is. Voor taurine werd dit in kabeljauw trouwens bevestigd (Jones 1955 b). Een beduidende bakteriële afbraak van taurine is daarenboven weinig waarschijnlijk, daar dit aminozuur als relatief inert bekend staat.

Over de bakteriële afbraak van sarcosine is weinig bekend. Een omzetting tot methylamine en glyoxylzuur, onder invloed van bacterieel glycine oxydase, zoals door Ratner (1944) vastgesteld, grijpt waarschijnlijk niet plaats, daar slechts in enkele gevallen methylamine wordt gevonden (zie 4.2.2.11.). De kans dat sarcosine in serine wordt omgezet, zoals door Shieh (1964, 1966) bij een mariene bacterie, *Achromobacter cholinophagum*, werd waargenomen, is eveneens klein, daar geen vrij serine wordt gedoseerd (zie verder).

Tyrosine (figuur 40) wordt pas vanaf de 5de dag waargenomen en stijgt vlug tot ongeveer de 12de dag om dan (op één uitzondering na, nl. $\frac{0}{+}$ geslachtsrijp, herfst) licht te dalen. Bij de niet geslachtsrijpe dieren zijn de stijging en de daaropvolgende daling sterker.

Volgens Partmann (1951) zou tyrosine een van de aminozuren zijn die tijdens de proteolyse van vis het gemakkelijkst vrijkomen. Alhoewel dit niet bij alle vissen werd vastgesteld (Ranke 1960) kan men deze vooropstelling bij de doornhaai althans volgen, daar in pas gevangen vissen geen vrij tyrosine voorkomt maar het gehalte vroeg begint te stijgen. Tyrosine blijkt dan ook een goede indikator van de eerste tekens van bederf te zijn.

Zoals vermeld in 3.2.2.6. komt in pas gevangen doornhaai weinig of geen vrij lysine voor. Zoals bij tyrosine stijgt echter het gehalte vrij vlug vanaf de 5de tot de 12de dag (figuur 41). Bij

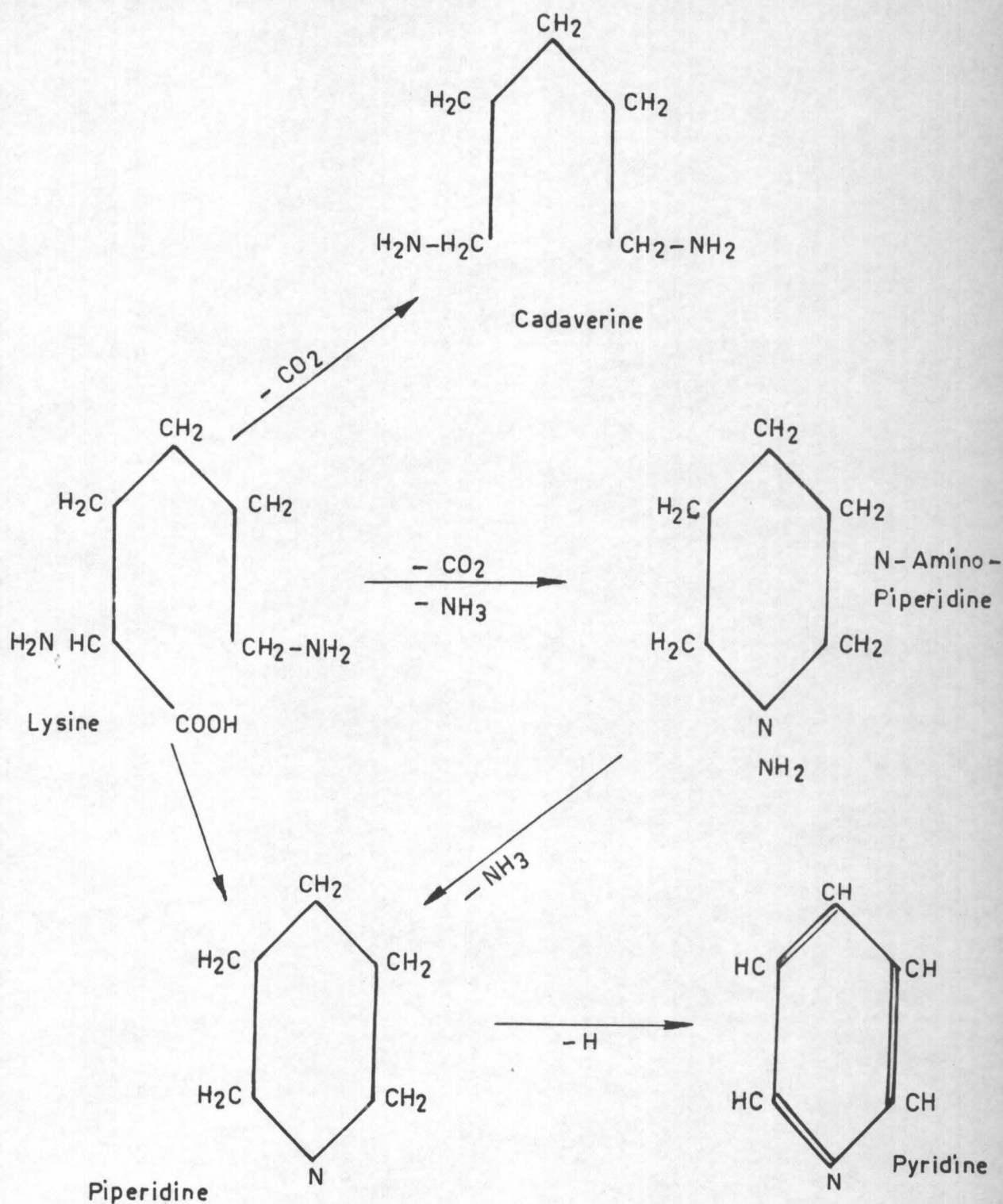


Fig. 42 – Biochemische afbraak van lysine volgens Bramstedt (1957)

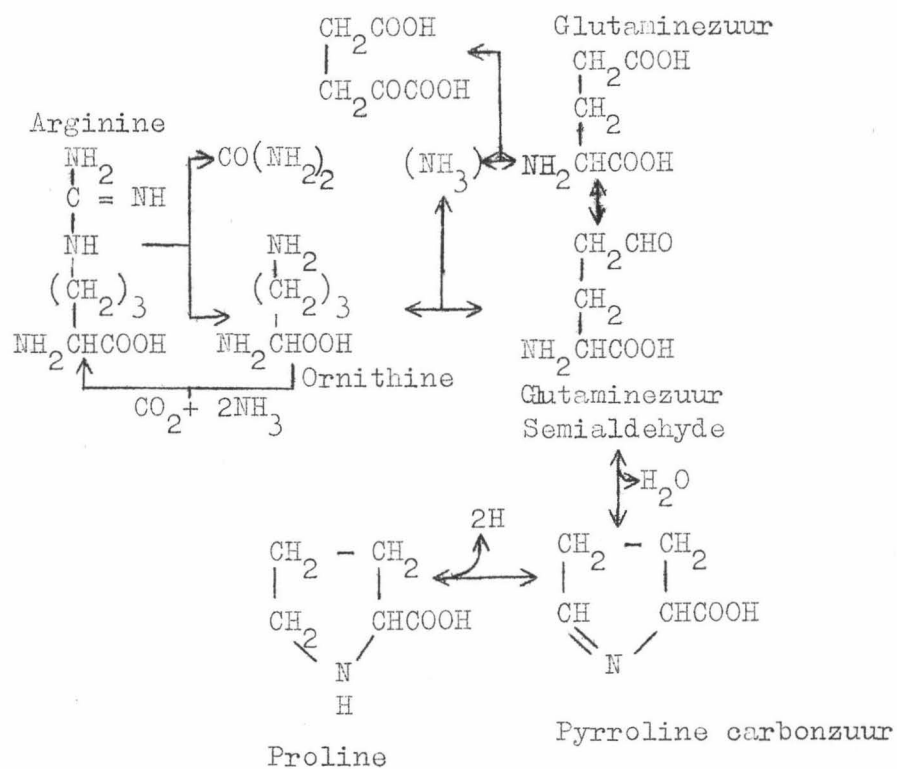


Fig. 43. Metabolische verwantschap van de 5C-aminozuren
(Fruton en Simmonds 1961)

de geslachtsrijpe dieren wordt dan, op twee uitzonderingen na, nog een lichte stijging waargenomen. Voor de kleine doornhaaien is de vermeerdering van het lysine-gehalte sterker. Vanaf de 12de dag echter wordt op één uitzondering na, een daling waargenomen. Uit de literatuur is genoegzaam bekend dat lysine relatief inert is, en dat het aan transamineringen en desamineringen van de α -aminogroep weinig of niet deelneemt. Pas in latere stadia wordt het tot cadaverine gede-carboxyleerd. Ook de vorming van piperidine, N-aminopeperidine en pyridine in vis werd waargenomen (Bramstedt 1957)(figuur 42).

Daar de kleine doornhaaien zich tussen de 12de en de 19de dag in een verder stadium van bederf dan de geslachtsrijpe individuen bevinden, kan de daling van het lysine-gehalte tijdens deze periode door de vorming van deze stoffen worden verklaard.

Methionine verschijnt pas de 12de dag bij de geslachtsrijpe en de 9de dag bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien in concentraties begrepen tussen 1 en 5 mg %. Dit gehalte ondergaat weinig veranderingen tijdens de daarop volgende bewaarperiode.

Ornithine wordt enkel vanaf de 9de dag bij de vier visgroepen waargenomen. Het gehalte vertoont verder geen duidelijke lijn en schommelt tussen 2 en 7 mg %. Ornithine kan uit arginine gevormd worden onder invloed van het arginase. Dit enzym wordt in de weefsels van doornhaai aangetroffen (zie 1.2.2.1.) ; een endogene vorming van ornithine is echter weinig waarschijnlijk, daar zoals vermeld het enzym ornithine carbamyl transferase ontbreekt. Het is echter bewezen dat vele mikro-organismen (o.a. soorten die op vis voorkomen) enzymen bevatten die arginine tot ornithine kunnen afbreken (Thornley 1960). Vele bakteriën kunnen echter ook proline en glutaminezuur tot ornithine omzetten. Deze aminozuren zijn trouwens met ornithine metabolisch verwant (Fruton en Simmonds 1961) (figuur 43).

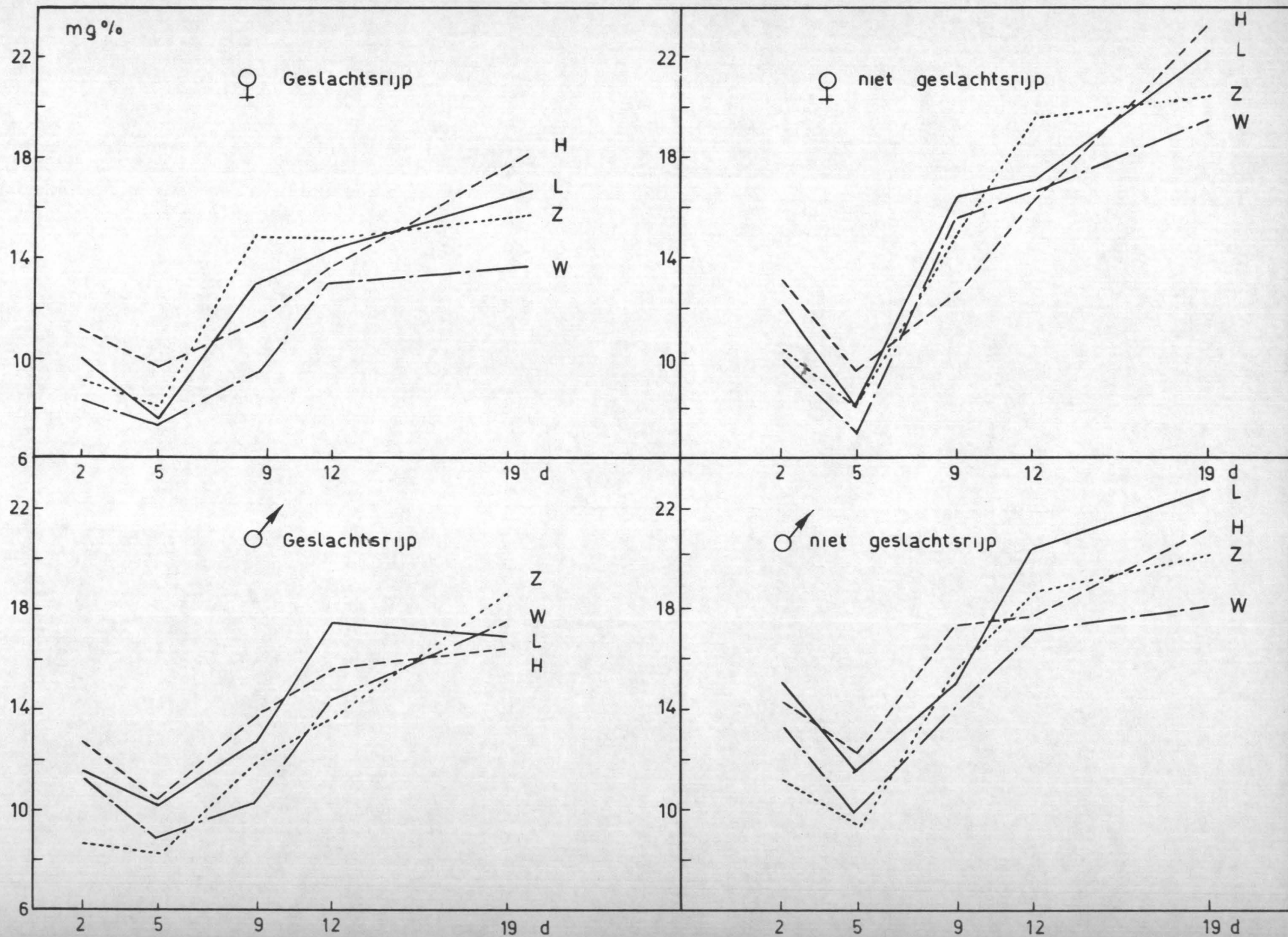


Fig.44 - Verloop van cysteïne in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

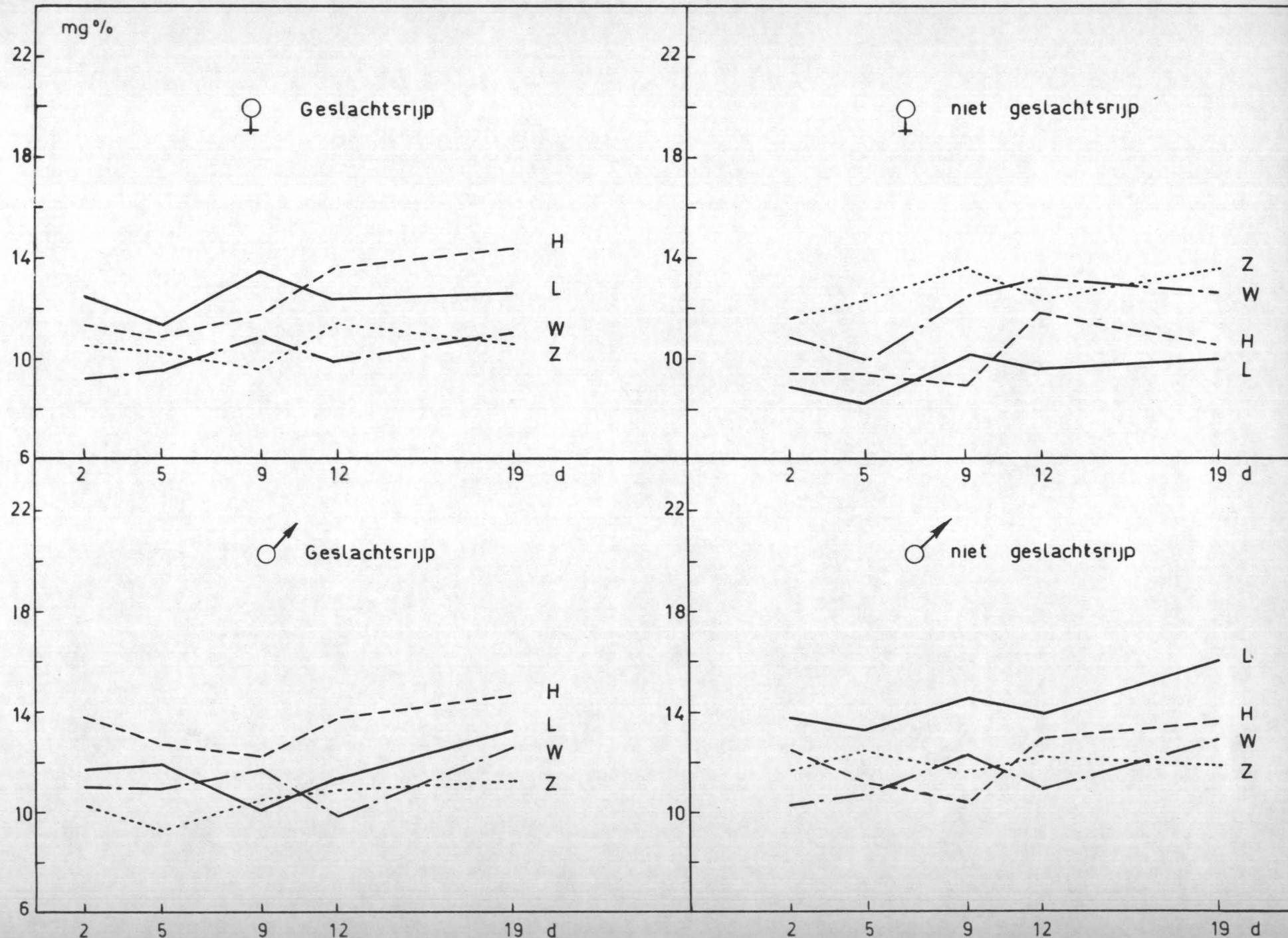


Fig. 45 - Verloop van cystine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

Serine en valine verdwijnen reeds vanaf de 5de dag hetgeen erop wijst dat de afbraakreacties van deze aminozuren sterker doorgaan dan de vormingsreacties.

Van histidine wordt slechts in enkele gevallen sporen aangetroffen. Vrij histidine komt aldus én in pas gevangen doornhaai én tijdens het bewaren van deze vis praktisch niet voor, hetgeen volledig in tegenstelling met de meeste beenvissen is (zie 3.2.2.6.).

In 5 gevallen wordt de 9de, 12de en 16de dag α -aminoboterzuur vastgesteld (1 tot 3 mg %). In 8 gevallen wordt bij de kleine doornhaaien de 19de dag γ -aminoboterzuur gevonden. Daar dit aminozuur door decarboxylering van glutaminezuur ontstaat, wijst dit er nogmaals op dat deze soort reacties pas in een gevorderd bederfstadium doorgaan.

Tenslotte kan worden vermeld dat op verschillende chromatogrammen onbekende vlekken voorkwamen die met de klassieke kleurreactia niet konden worden geïdentificeerd. Het betreft waarschijnlijk lagere peptiden, amiden en andere minder voorkomende aminozuren en ninhydrinepositieve stoffen. Op te merken valt hierbij dat ook nietstikstofverbindingen (bv. aldehyden en ketonen) met ninhydrine een positieve reactie kunnen geven (Zacharius en Talley 1962 ; Schilling et al. 1963). Geen enkele onbekende vlak kwam echter konstant voor of bleek duidelijke concentratieveranderingen tijdens de bewaarperiode van *S. acanthias* te vertonen.

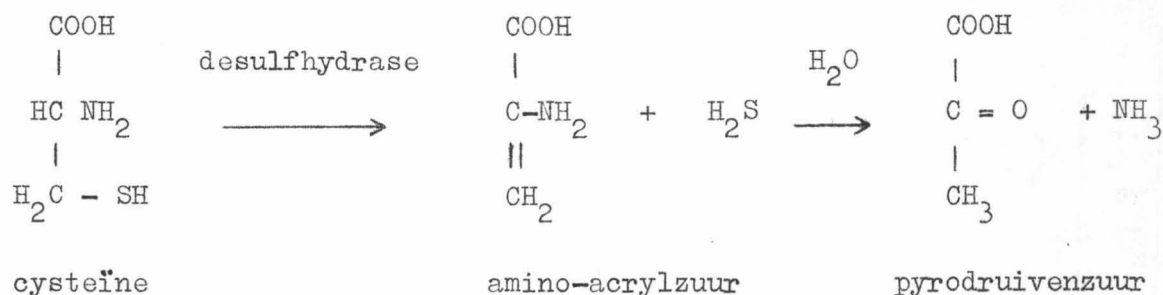
4.2.2.8. Cysteïne en cystine (figuren 44 en 45).

Cysteïne vertoont de vijfde dag een daling, die hoofdzakelijk aan het uitlogen te wijten is (zie 4.2.1.).

Vanaf deze datum wordt een regelmatige stijging waargenomen, die bij de niet geslachtsrijpe dieren sterker blijkt te verlopen en hogere waarden bereikt na 18 dagen (gemiddeld 20,9 t.o.v. 16,7 mg %). Dit wijst erop dat de reacties die tot het vrijstellen en/of de vorming van cysteïne leiden sterker zijn dan de afbraakreacties, en dat het verschil bij de kleine dieren het grootst is.

Het meest typische afbraakproduct van cysteïne is waterstof-sulfide, dat door toedoen van een desulphydrase wordt gevormd.

Op te merken valt dat verschillende mikro-organismen (bv. E. Coli) in staat zijn door eenvoudige waterafplitsing, het cysteïne terzelfdertijd te desamineren (Leuthardt 1963) :



Uit tabel 12 volgt dat de vorming van H_2S echter relatief gering is. Het wordt enkel vanaf de 12de dag waargenomen en dan nog niet tijdens alle proeven. Er werd hier evenmin een duidelijk invloed van het geslacht of van het seizoen vastgesteld. Voor de niet geslachtsrijpe dieren is het H_2S -gehalte echter meestal duidelijk hoger (gemiddeld 26,1 t.o.v. 16,6 $\mu\text{g} \%$ de 19de dag), hetgeen op een grotere afbraak van cysteïne wijst.

Daar echter bij de kleine dieren het cysteïne-gehalte toch meer stijgt, bevestigt dit dat de vormingsreactie van cysteïne sterker zijn dan de afbraakreacties.

Tabel 12 - Evolutie van het waterstofsulfide-gehalte tijdens het be-
waren van *S. acanthias* (in $\mu g \%$).

♀ geslachtsrijp									
Lente					Zomer				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	5,1	22,4	0	0	0	0	17,6
Herfst					Winter				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	2,4	13,8	0	0	0	4,0	15,2
♀ niet geslachtsrijp									
Lente					Zomer				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	0	33,8	0	0	0	8,7	27,6
Herfst					Winter				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	6,8	30,3	0	0	0	4,5	23,1
♂ geslachtsrijp									
Lente					Zomer				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	0	12,9	0	0	0	2,1	15,4
Herfst					Winter				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	0	21,5	0	0	0	5,0	17,4
♂ niet geslachtsrijp									
Lente					Zomer				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	7,5	25,0	0	0	0	6,3	22,2
Herfst					Winter				
<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
0	0	0	5,4	26,8	0	0	0	3,9	20,5

In verband met de afwezigheid van waterstofsulfide tot een ver gevorderd bewaarstadium kan gewezen worden op het feit dat H_2S zeer onbestendig is en gemakkelijk tot sulfaat kan worden geoxydeerd. Het is dan ook mogelijk dat vóór de 12de dag toch kleine hoeveelheden H_2S werden gevormd maar dat deze onmiddellijk werden geoxydeerd.

Verder dient vermeld dat de bakteriële vorming van H_2S bij voorkeur in anaëroob midden gebeurt. Dit werd door McLean en Castell (1956) bij Gadidae bevestigd.

In zuiver aëroob midden kan men verwachten dat cysteïne en andere SH-verbindingen zeer snel hetzij door bakteriën, hetzij door de luchtzuurstof geoxydeerd worden. Het feit dat tijdens deze proeven echter een stijging van het vrije cysteïne-gehalte en tevens de aanwezigheid van H_2S op het einde van de bewaarperiode werden genoteerd, wijst op een tegenovergesteld verschijnsel en kan o.a. worden verklaard door het feit dat tijdens het bederf de consistentie van de doornhaaiweefsels meer en meer gelatineus wordt (zie 4.2.1.) en dat hierdoor het milieu meer en meer anaëroob wordt.

Dit wordt door de bepalingen van het indol-gehalte bevestigd. Zoals bekend uit de literatuur wordt deze verbinding het gemakkelijkst in anaëroob midden door bakteriële aktie uit tryptofaan gevormd (Fruton en Simmonds 1961). Uit aanvullende proeven bleek indol - zoals waterstofsulfide - slechts op het einde van de bewaarperiode in geringe concentraties (0,2 tot 0,4 mg %) voor te komen.

Men dient hierbij niet uit het oog te verliezen dat de meerderheid van de bakteriën anaëroob zijn en dat door de grote hoeveelheden die op het einde aanwezig zijn, de zuurstofspanning vlug daalt (Shewan 1961 ; Soudan 1965).

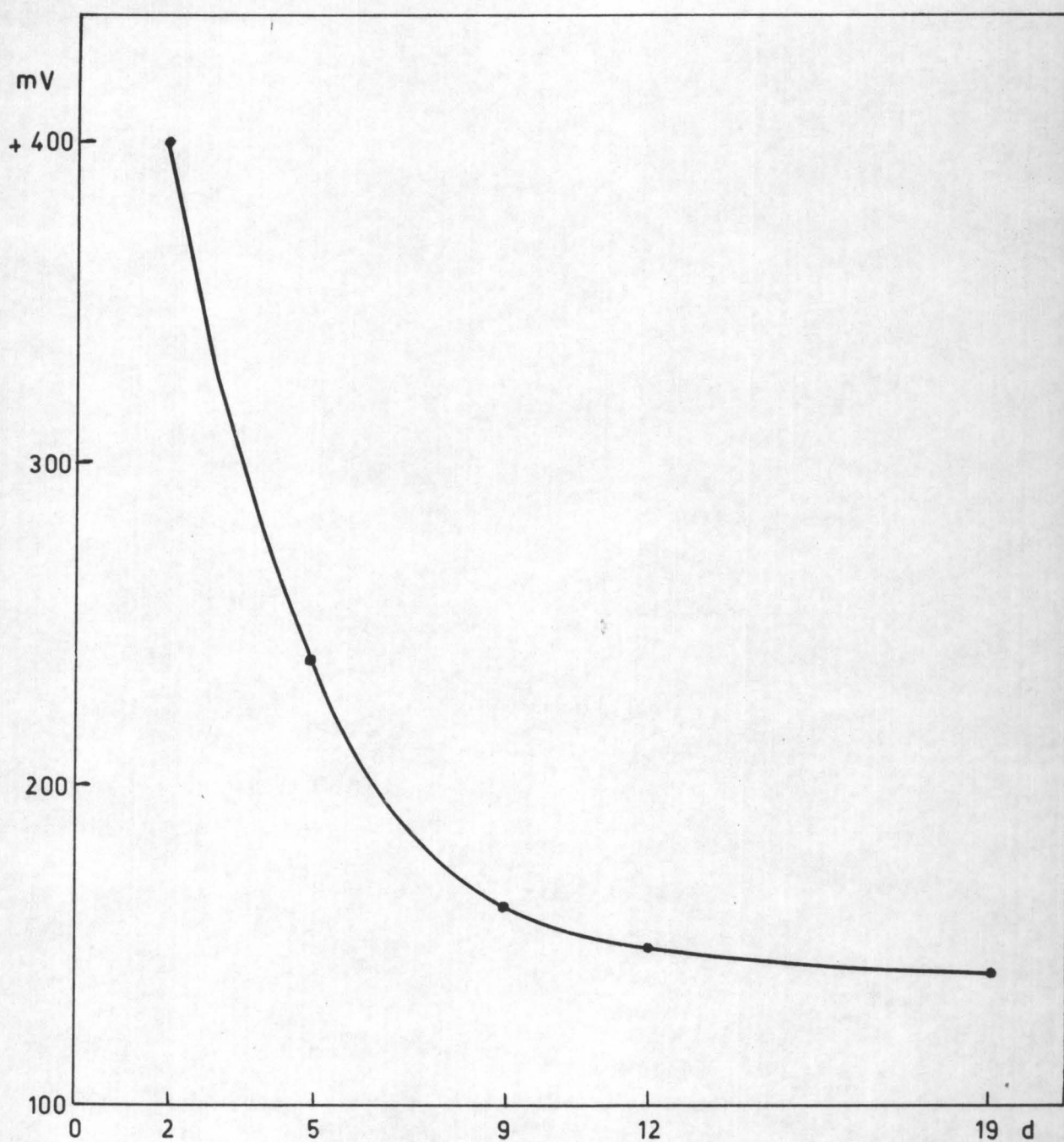


Fig. 46 - VERLOOP VAN DE REDOXPOTENTIALAAL TIJDENS HET
BEWAREN VAN *S. ACANTHIAS*

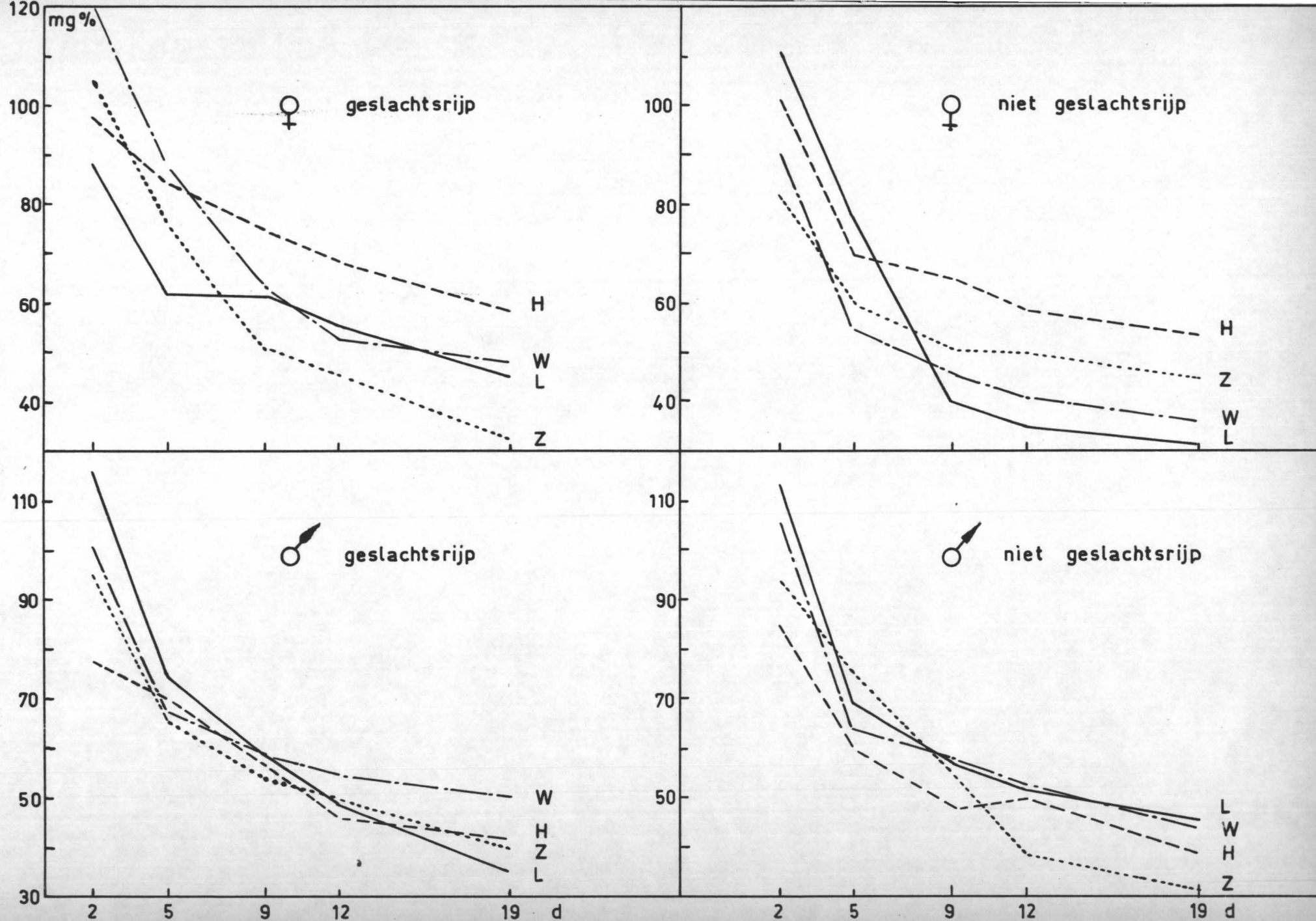


Fig. 47 – Verloop van proline in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

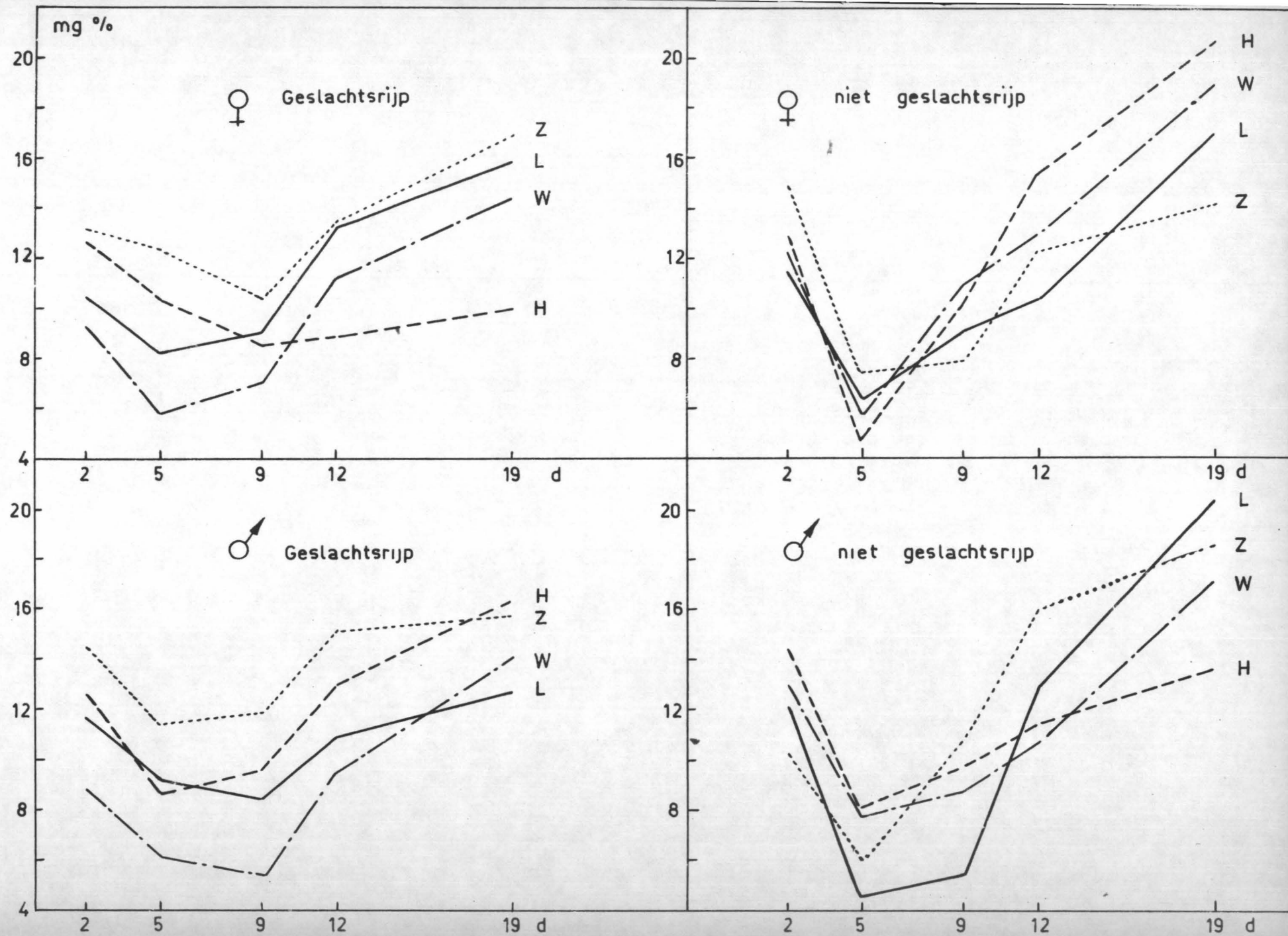


Fig. 48 - Verloop van hydroxyproline in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

Daarenboven kan gewezen worden op het feit dat naarmate het bederf vordert, de redoxpotentiaal van het midden daalt (figuur 46). Volgens Barnes en Ingram (1955) zou dit de groei van de anaëroben stimuleren. Het dalen van de redoxpotentiaal zal daarbij de neiging tot oxydatie van cysteïne eveneens verminderen.

Tenslotte dient vermeld dat bepaalde mikro-organismen in staat zijn SO_4^{--} , SO_3^{--} , en S^{--} voor de synthese van zwavelhoudende aminozuren te gebruiken (Henderickx 1961) zodat cysteïne ook hieruit kan worden gevormd.

Het vrij cystine-gehalte tenslotte vertoont in tegenstelling met het cysteïne-gehalte een eerder vlak verloop (figuur 45). Het stijgend gehalte aan cysteïne heeft aldus blijkbaar geen invloed op het cystine-gehalte.

4.2.2.9. Proline en hydroxyproline (figuren 47 en 48).

Bij proline wordt een algemene concentratievermindering vastgesteld. Deze vermindering is echter tussen de 2de en de 5de dag het sterkst, en is hoofdzakelijk te wijten aan het uitlooeffect (zie 4.2.1.). Er dient hierbij niet uit het oog verloren te worden dat proline één van de meest oplosbare aminozuren is, nl. 162 g per 100 ml water. Bij de niet geslachtsrijpe dieren is deze daling nog sterker door het groter relatief oppervlak.

In de verdere bewaarperiode wijzen de dalende kurven op een biochemische afbraak van proline. Hierbij kunnen diverse verbindingen worden gevormd, o.a. glutaminezuur, ornithine, α -aminovaleriaanzuur, die dan verder door desamineringen en decarboxyleringen worden afgebroken. Het kan ook door rechtstreekse oxydatie hydroxyproline geven (Stetten 1951) alhoewel dit hier minder waarschijnlijk is daar de redoxpotentiaal daalt (figuur 46).

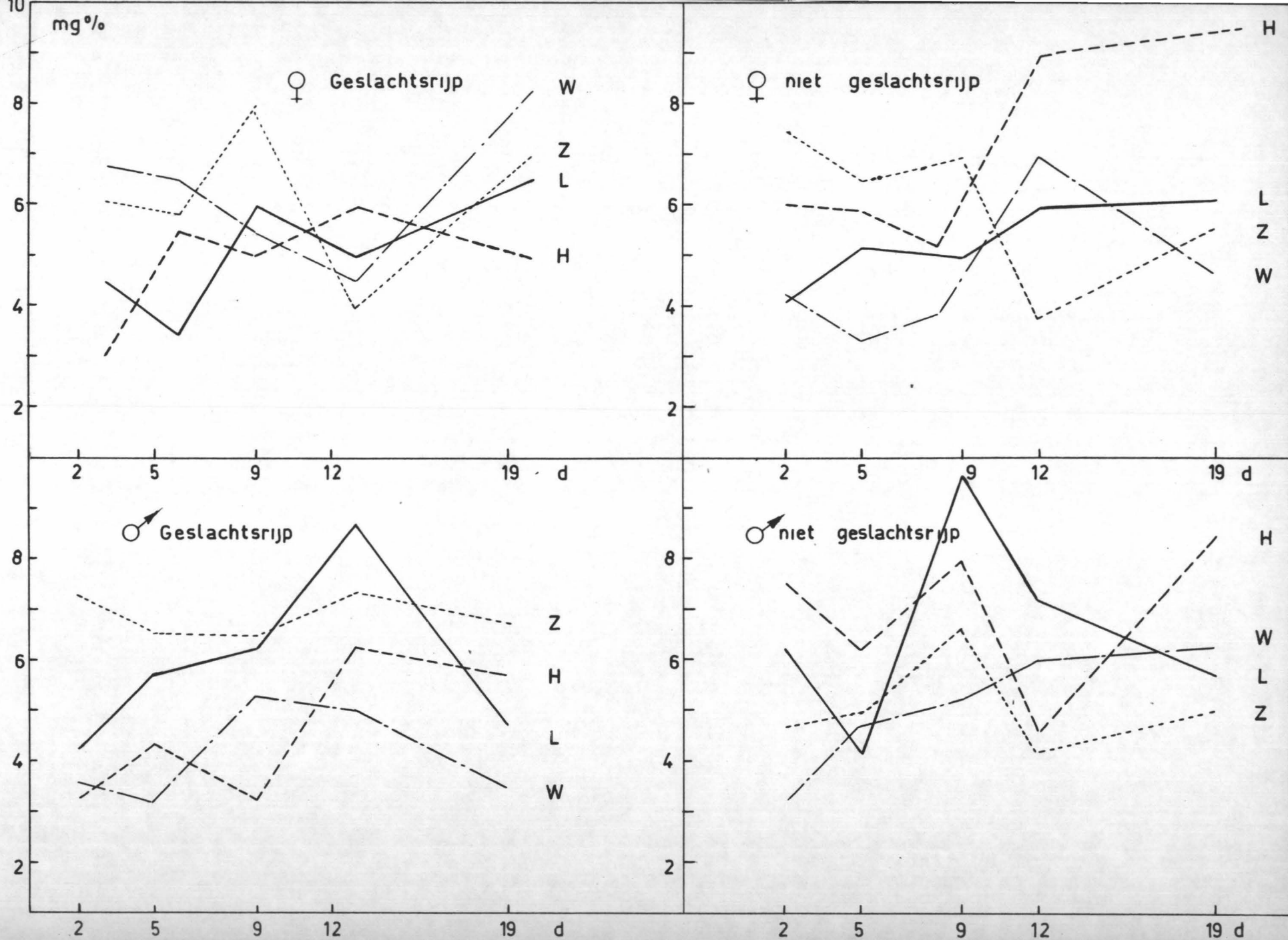


Fig. 49 - Verloop van choline in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

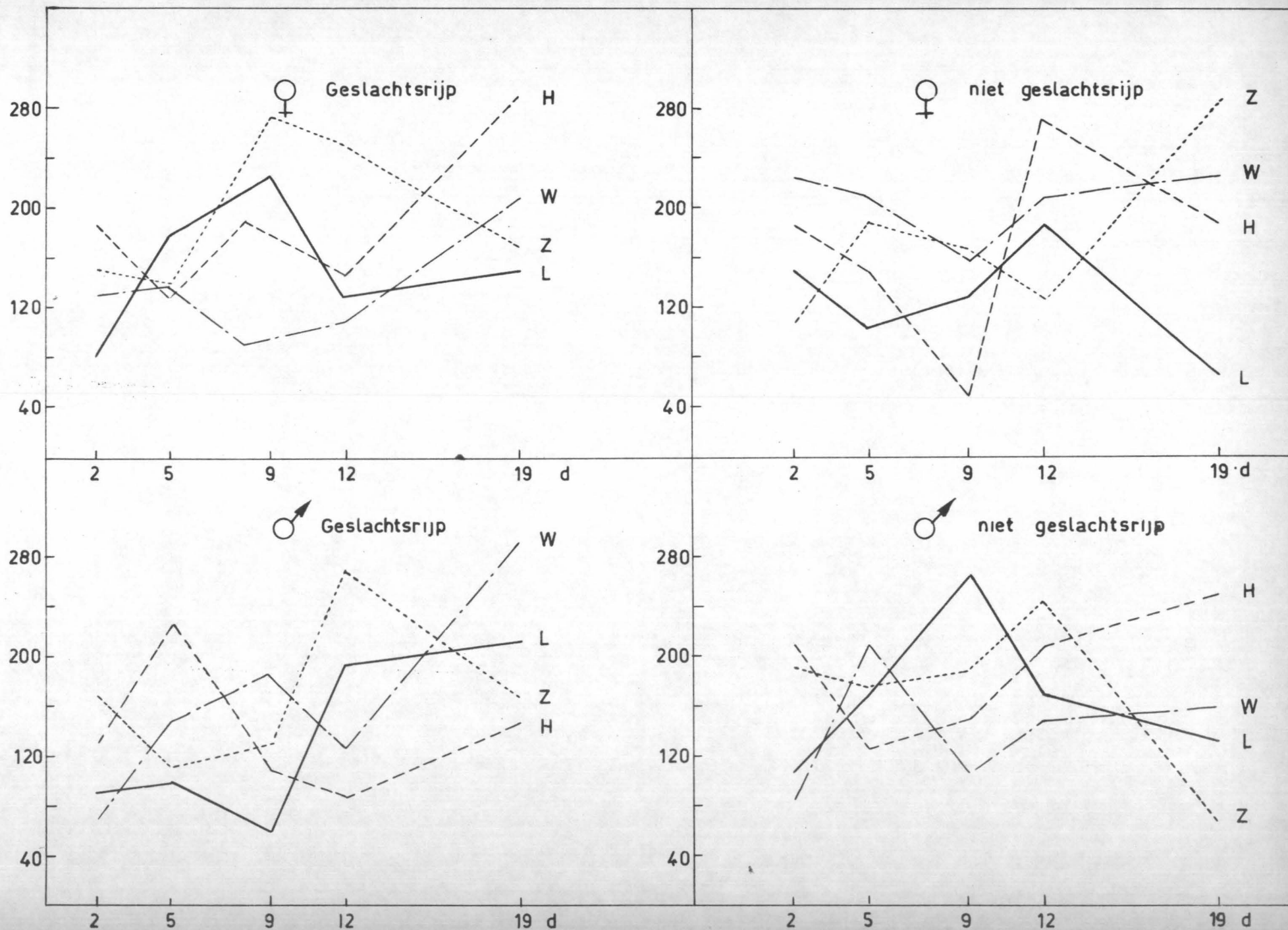


Fig. 50 - Verloop van betaine in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

Hydroxyproline vertoont een ander beeld. Tot de vijfde, of in sommige gevallen de negende dag, wordt een daling vastgesteld, die alhoewel de uitloogproef het niet met absolute zekerheid kan uitmaken (zie 4.2.1.) ongetwijfeld aan het spoeeffect te wijten is. Bij de niet geslachtsrijpe dieren is deze daling trouwens scherper, hetgeen deze vooropstelling kracht komt bijzetten. Vanaf de 5de of 9de dag echter treedt een vermeerdering van het hydroxyprolinegehalte op. Alhoewel een vorming door oxydatie van proline (zie boven) niet uitgesloten is, komt deze stijging ongetwijfeld vooral van de steeds verder doorgedreven degradatie van de bindweefsels. Dit iminozuur komt immers praktisch uitsluitend in de eiwitten van deze weefsels voor.

Het feit dat het hydroxyproline voor mikro-organismen niet levensnoodzakelijk is (Neuman en Logan 1950) is verder waarschijnlijk niet vreemd aan deze geleidelijk ophoping van het vrije iminozuur.

4.2.2.10. Vrij choline en betaïne.

Uit figuren 49 en 50 blijkt dat zowel het choline- als het betaïnegehalte zeer onregelmatig verlopen en dat geen enkele duidelijke lijn kan worden aangegeven. Om dezelfde reden is het eveneens onmogelijk uit te maken of er een invloed van het seizoen, het geslacht of de geslachtsrijpheid bestaat.

De redenen van dit onregelmatig verloop konden hier niet uitgemaakt worden. Wel kan erop gewezen worden dat beide verbindingen geen eindprodukten zijn. Men kan ook besluiten dat de reacties die tot de vorming en/of de afbraak van vrij choline en betaïne leiden sterk door het milieu worden beïnvloed. Als methyldonoren kunnen choline en betaïne in talrijke reacties tussenkomen, die door een wijziging in het milieu kwalitatief en kwantitatief kunnen verschillen.

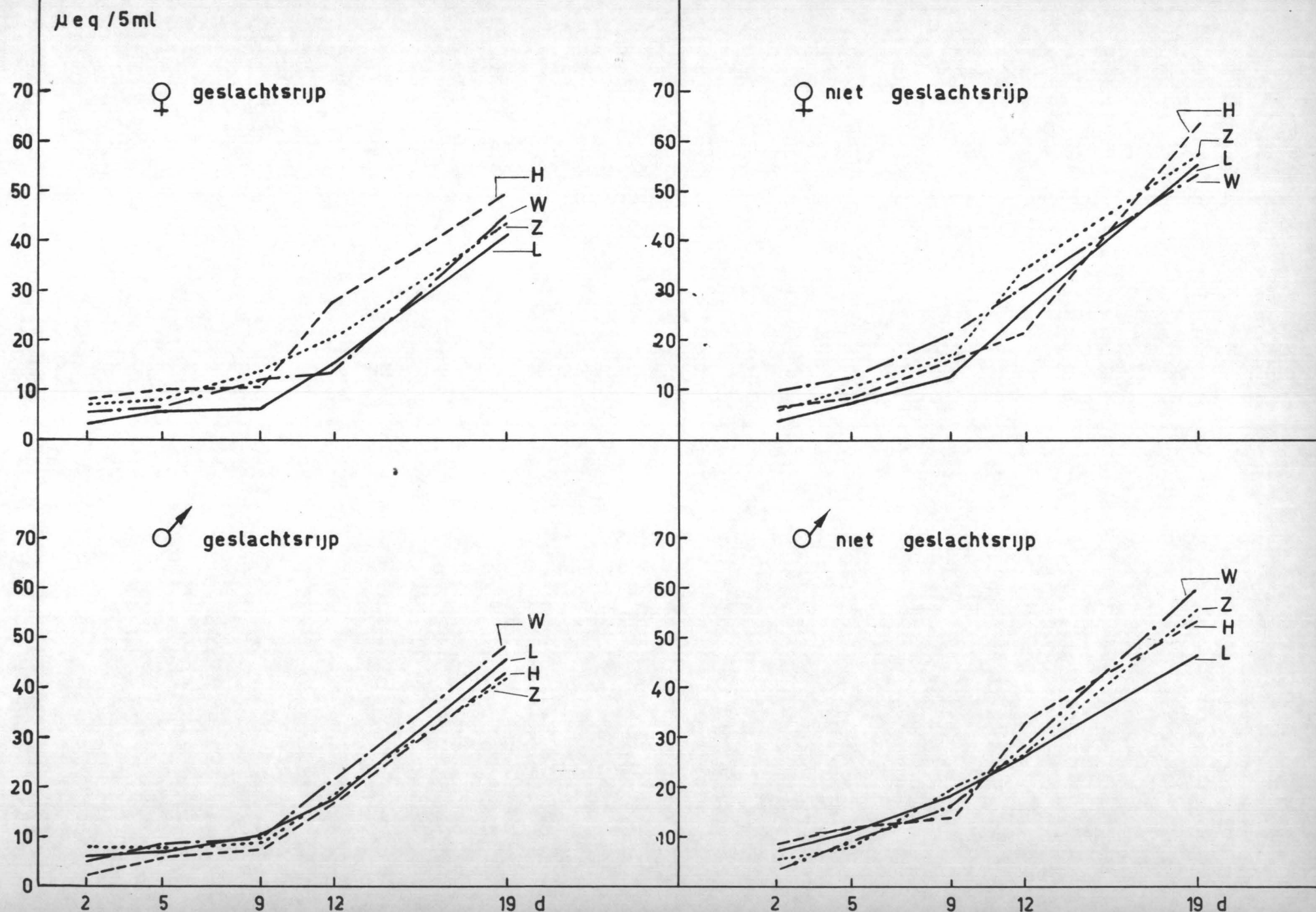


Fig. 51 - Verloop van VRS in *Sacanthias* tijdens het bewaren.

Er dient ook benadrukt te worden dat beide verbindingen gemakkelijk door oxydatie of reductie in elkaar kunnen overgaan zodat ook dit feit wellicht het beeld ingewikkelder maakt. Tenslotte kan worden vermeld dat Lovern (1962) kon aantonen dat een vorming van vrij choline uit fosfolipiden bij doornhaai tijdens de normale opslag in ijs verwaarloosbaar klein is, alhoewel deze fosfolipiden in hoeveelheden van 553 tot 910 mg % voorkomen, waarvan de helft ongeveer lecithine is. Deze faktor althans kan hier dan ook uitgeschakeld worden.

4.2.2.11. Methylamine.

In 17 % van de proeven wordt de 19de dag een kleine hoeveelheid methylamine vastgesteld die tussen 0,5 en 1,5 mg N % schommelt. De vorming van dit amine blijkt dus enkel in een gevorderd bederfstadium plaats te grijpen (tot de 12de dag werd het niet waargenomen) en onregelmatig van natuur te zijn.

4.2.2.12. Dimethylamine.

Bij geen enkele proef wordt de aanwezigheid van dimethylamine waargenomen. Dit bevestigt de proeven van Soudan (1965) die vaststelde dat het amine niet in doornhaai gevormd wordt.

4.2.2.13. Vluchtige reducerende stoffen (figuur 51, tabel A38).

Bij de geslachtsrijpe dieren geschiedt slechts een geringe stijging van het VRS-gehalte gedurende de eerste negen dagen ; nl. van gemiddeld 5,9 tot 9,7 μ eq. Vanaf deze dag stijgen de VRS-waarden snel om na 19 dagen een gemiddelde van 44,9 μ eq te bereiken.

Bij de niet geslachtsrijpe dieren echter is de stijging gedurende de eerste negen dagen gevoeliger, nl. van gemiddeld 6,5 tot 17,2 μ eq en bereikt na 19 dagen hogere waarden, nl. gemiddeld 54,7 μ eq.

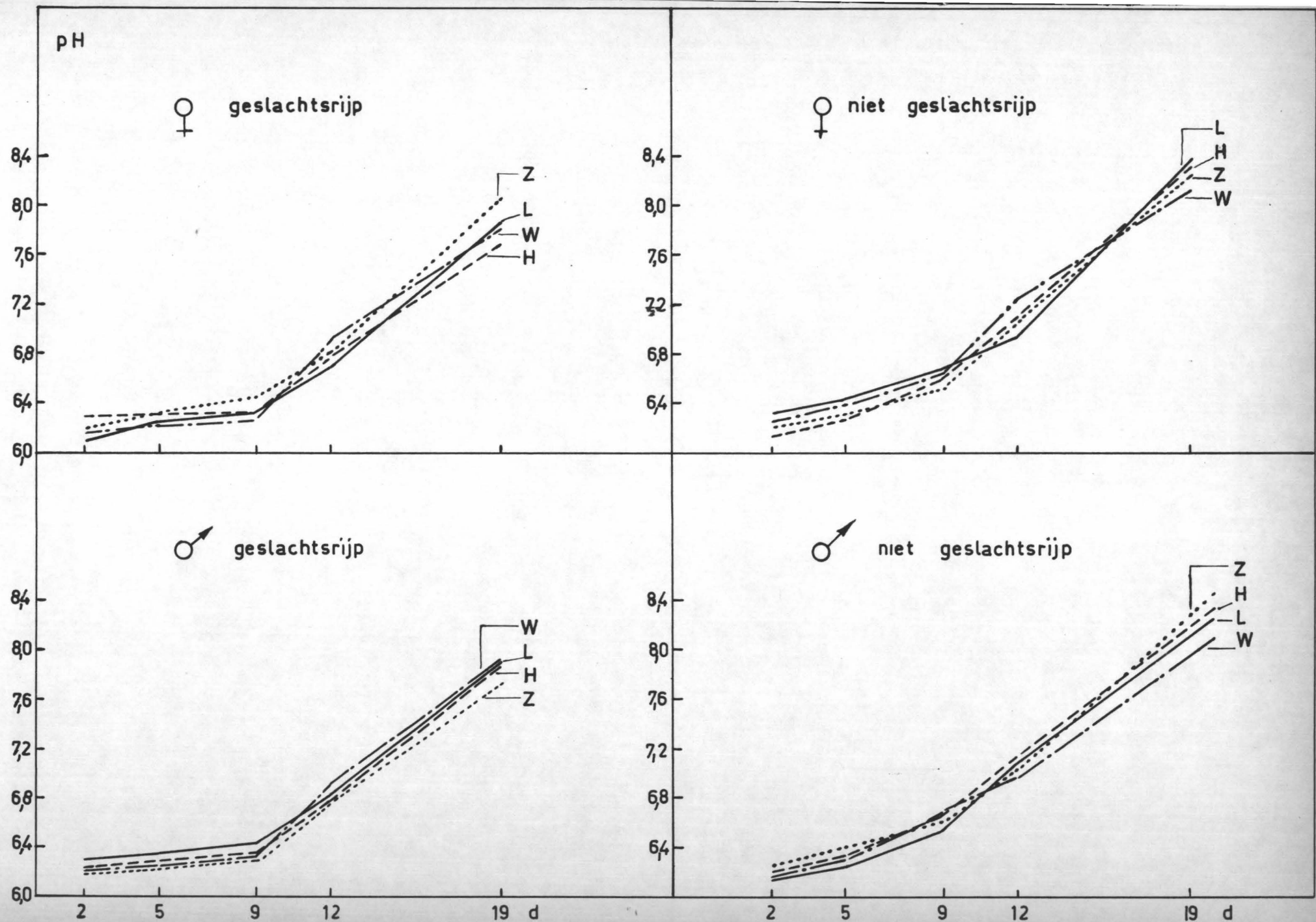


Fig.52 – Verloop van de pH. in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

Dit hoger gehalte kan te wijten zijn noch aan het hogere ammoniakgehalte (zie figuur 20) daar de VRS-bepaling niet door ammoniak beïnvloed wordt, noch aan trimethylamine daar deze base bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien geen hogere waarden bereikt (figuur 23). De reden dient dus gezocht in andere vluchtige reducerende bederfverbindingen, zoals vluchtige zuren (o.a. H_2S), aldehyden, ketonen enz., die tijdens het bederf van de niet geslachtsrijpe doornhaaien sterker blijken gevormd te worden.

4.2.2.14. pH (figuur 52, tabel A39).

Onder invloed van de diverse biochemische reacties die zich tijdens het bederf van *S. acanthias* voordoen, en waarbij hoofdzakelijk alkalische afbraakprodukten vrijkomen, stijgt de pH in het visvlees.

Uit de bekomen resultaten blijkt echter dat de pH op verschillende wijze bij geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe doornhaaien evolueert. Bij de eerste categorie is er de eerste negen dagen weinig verandering waar te nemen, nl. van gemiddeld 6,21 tot 6,34. Vanaf de negende dag echter gaat de pH vlug omhoog om op de 19de dag gemiddeld 7,86 te bereiken.

Bij de niet geslachtsrijpe vissen grijpt er tijdens de eerste negen dagen ook een duidelijke stijging plaats, nl. van gemiddeld 6,22 tot 6,61. Vanaf deze periode neemt de pH nog vlugger toe en bereikt hogere waarden dan bij de geslachtsrijpe dieren, nl. gemiddeld 8,29.

Uit figuren 20 en 23 blijkt dat in de eerste plaats ammoniak hiervoor verantwoordelijk is en niet TMA, daar deze base in niet geslachtsrijpe dieren geen hogere waarden bereikt.

Voor de vier kategoriën doornhaai zijn de aanvangs-pH-waarden ongeveer gelijk. Het algemeen gemiddelde bedraagt 6,22, de laagste en

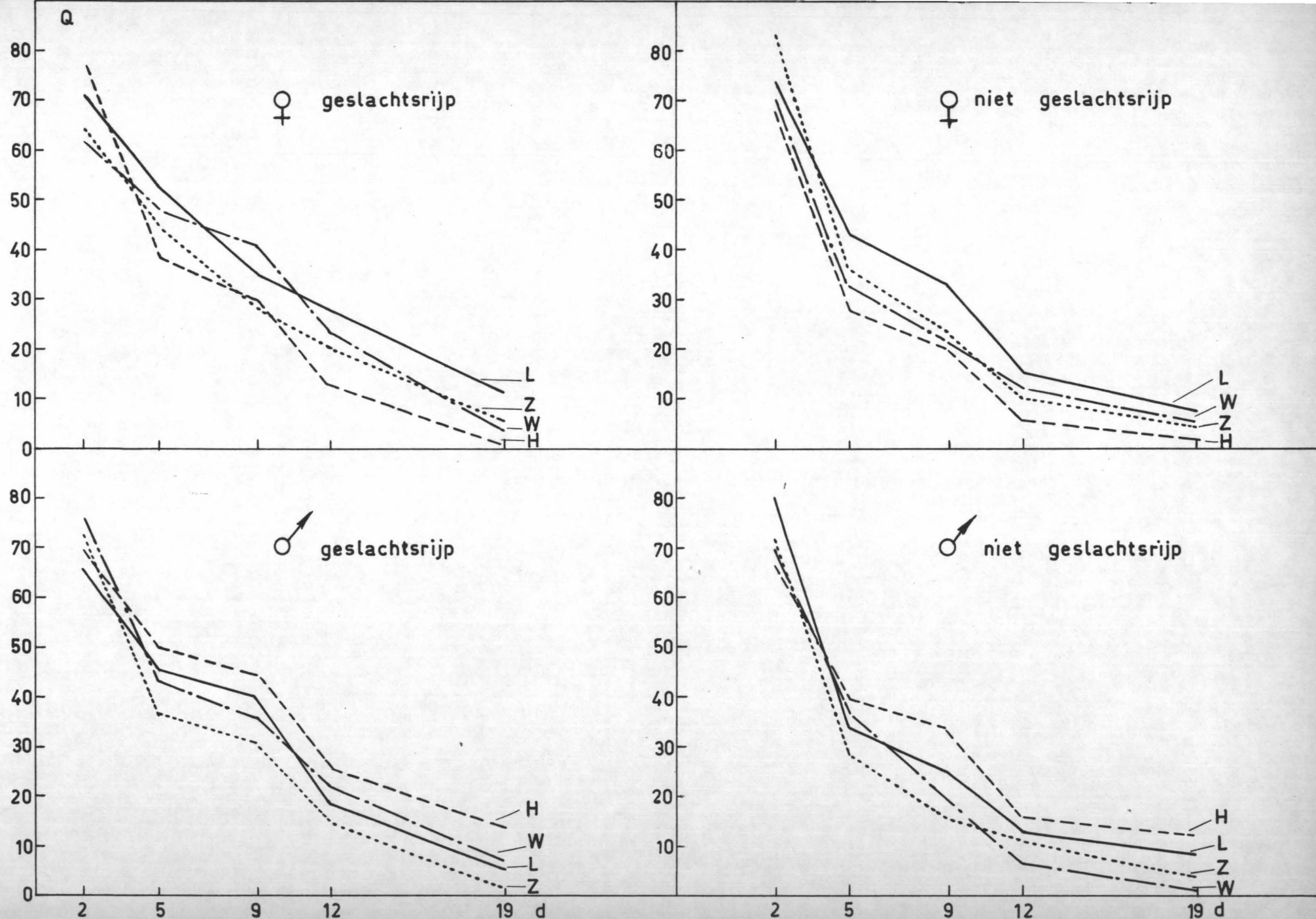


Fig. 53-Verloop van de elektrische weerstand in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

hoogste genoteerde waarden bedragen respectievelijk 6,08 en 6,37. Deze resultaten komen vrij goed overeen met de weinige die in de literatuur gevonden worden, nl. deze van Cutting (1953) die 6,2 tot 6,5 noteerde, van Moyer et al. (1959), die 6,2 tot 6,4 vond en van Misericordia (1960) die 6,2 tot 6,6 (gemiddeld 6,2) rapporteerde.

Over variaties van de pH tijdens het bewaren van doornhaai zijn echter alleen de proeven van Moyer et al. (1959) bekend, waarvan de resultaten dan nog volledig verschillend zijn. De pH bleek immers slechts weinig te stijgen en bereikte na 18 dagen slechts de waarde 6,8. Dit verschijnsel staat in verband met de abnormaal lage ammoniak- en TMA-waarden die door deze auteurs bekomen werden (zie 4.2.2.3.).

Tenslotte kan worden opgemerkt dat bij *S. acanthias* hogere waarden dan bij de beenvissen worden bereikt, waar bv. voor kabeljauw na 19 dagen een pH 7,2 wordt bekomen (Vyncke 1964).

4.2.2.15. Elektrische weerstand (figuur 53, tabel A40).

De Q-waarden van de geslachtsrijpe doornhaaien vertonen de eerste vijf dagen een gevoelige daling, nl. van gemiddeld 70 tot 45. Dit wijst erop dat de dielektrische eigenschappen van de celmembranen vanaf het begin van de bewaarperiode vlug veranderen. De verdere daling van de Q-waarden is dan afwisselend trager (5de tot 9de dag), terug sneller (9de tot 12de dag) en tenslotte opnieuw trager (12de tot 19de dag).

Bij de niet geslachtsrijpe dieren wordt een analoog beeld waargenomen met dit verschil echter dat de daling van de elektrische weerstand vlugger geschiedt en reeds vanaf de 5de dag een tiental Q-eenheden lager komt te liggen. De eindwaarden (19de dag) echter liggen op hetzelfde niveau. Dit betekent echter niet a priori dat

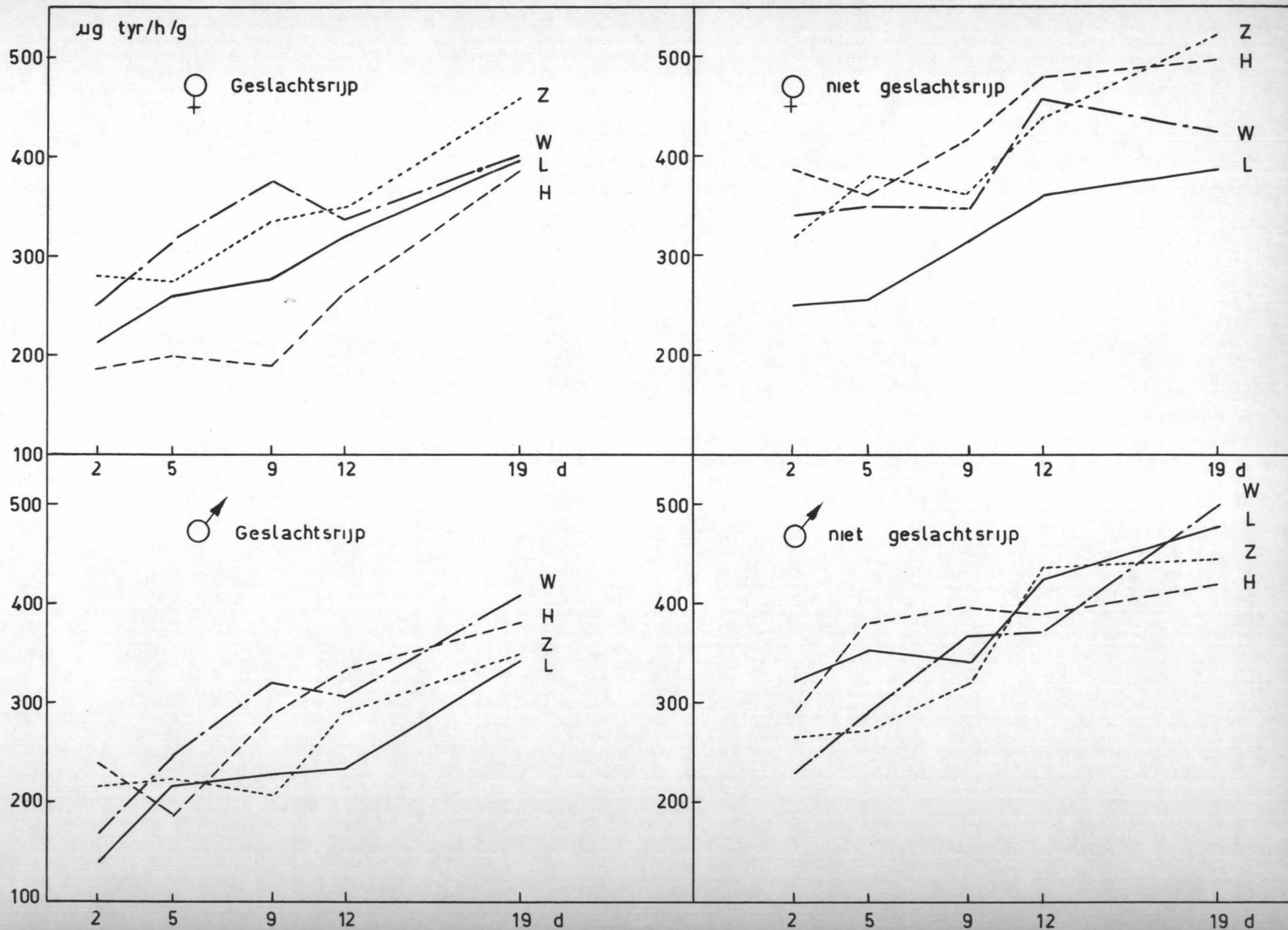


Fig. 54 - Verloop van de kathepsinenactiviteit in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

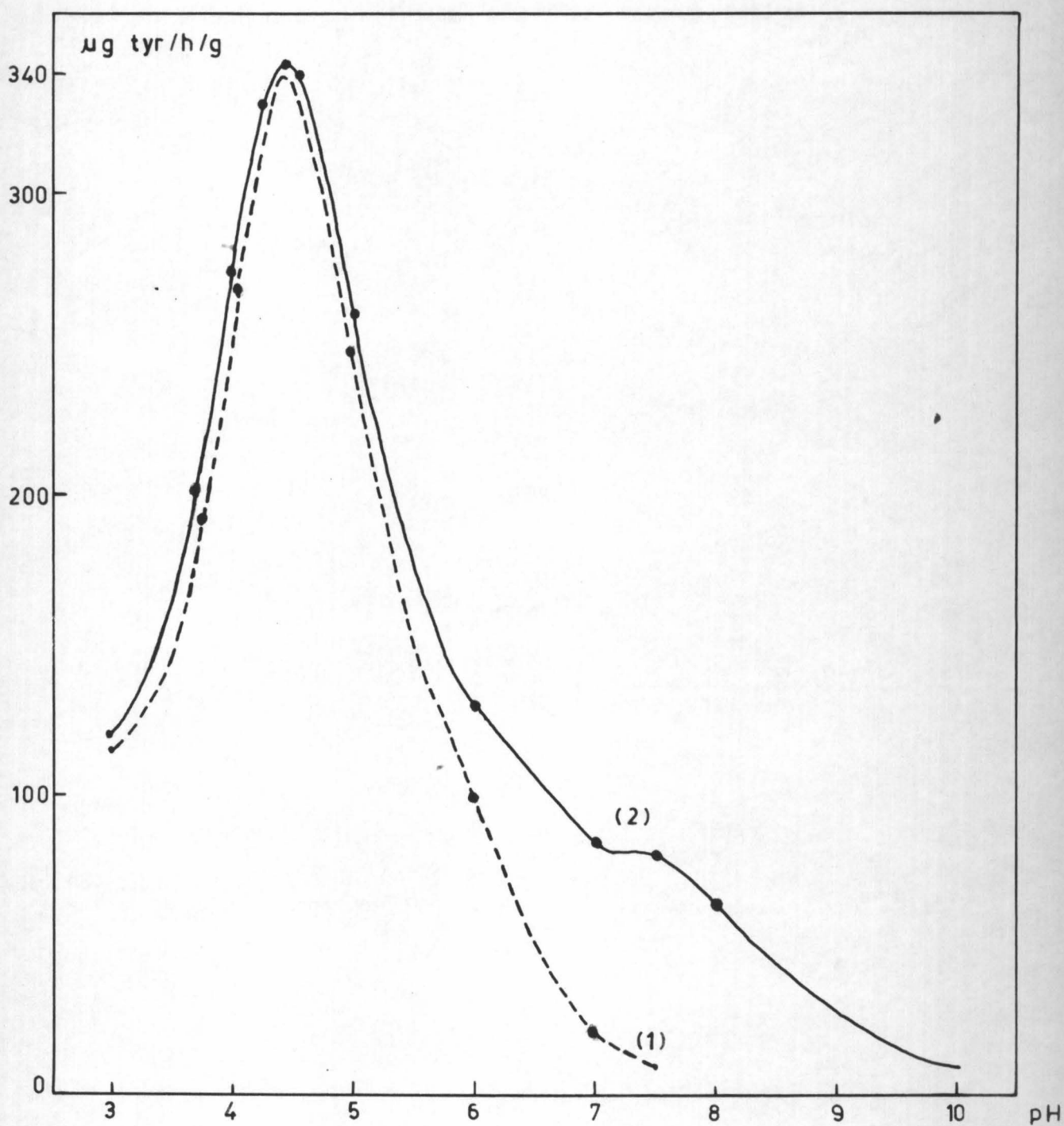


Fig. 55 - Proteolytische aktiviteit in funktie van de pH

(1): kathepsinen

(2): kathepsinen + neutrale endopeptidasen

beide viskategorieën op dit tijdstip in dezelfde staat van bederf verkeren. Men dient hierbij rekening te houden met het feit dat de Q-waarden asymptotisch naar 0 streven. (Hennings 1963). Om deze reden zijn de metingen beneden $Q = 10$ niet gevoelig genoeg meer.

4.2.2.16. Proteolytische aktiviteit.

- Kathepsinen (figuur 54).

De aktiviteit van de kathepsinen blijkt een algemene stijgende tendens te vertonen. Deze vermeerdering is voor de vier groepen doornhaai ongeveer gelijk. Voor de niet geslachtsrijpe dieren worden evenwel op het einde van de bewaarperiode hogere waarden genoteerd, maar ook de aanvangswaarden liggen, zoals reeds vroeger vermeld, hoger (zie 3.2.2.11.).

Als optimale pH wordt 4,5 gevonden (figuur 55, kurve 1). Deze pH blijkt tijdens de bewaarperiode niet te veranderen en is daarenboven gelijk ($\pm 0,1$ pH) voor alle onderzochte monsters. Dit geeft een aanwijzing dat de kathepsinen weinig veranderingen ondergaan tijdens de opslagperiode. Een verschuiving van de pH duidt immers meestal op een gewijzigd enzymenpatroon. De optimale pH voor de katheptische aktiviteit van niet gezuiverde enzymenextrakten van doornhaai werd tot nog toe niet bepaald. Voor andere vissen werden volgende pH-waarden genoteerd : haring (*Clupea harengus* : 3,5 (Luypen 1959), makreel (*Scomber tapeinocephalus*) en haai (*Mustelus griseus*) : 3,6 (Saito en Sameshima 1958), kingklip (*Acanthistius sebastoides*) : 4,5 en heek (*Merluccius capensis*) : 5,0 (de Koning en Papendorf 1965). Ter vergelijking kan vermeld worden dat voor hogere dieren (rund, konijn, kip) een waarde van ongeveer 3,8 wordt opgegeven (Berman 1967).

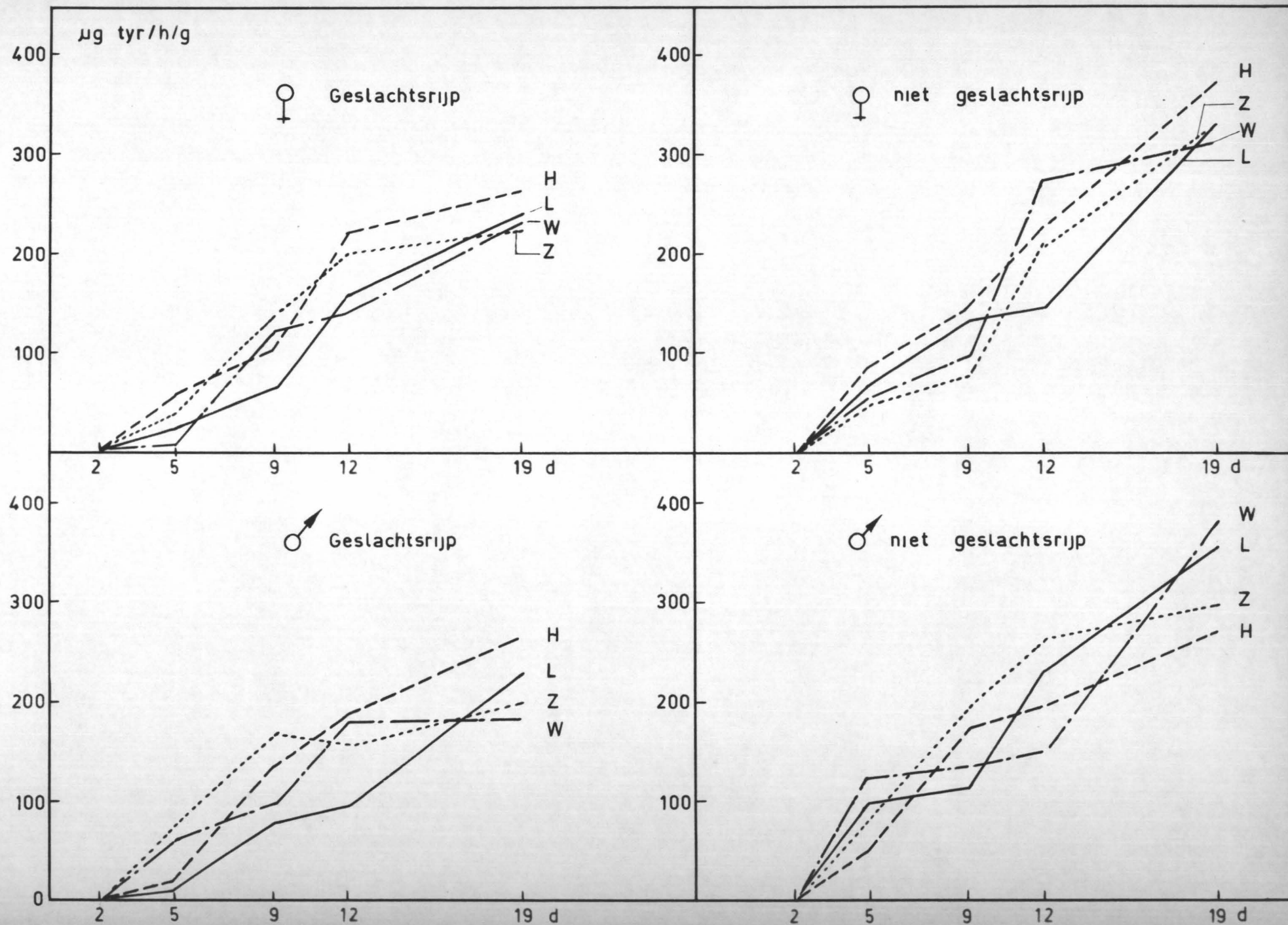


Fig.56 - Verloop van de activiteit van de neutrale endopeptidasen in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

Alhoewel lager dan de waarden door Siebert (1958) voor andere vissoorten opgegeven (460 tot $1.035 \mu\text{g tyr/h/g}$) is de katheptische aktiviteit van doornhaai nog op een hoog peil, vergeleken met deze van zoogdieren.

Men dient echter niet uit het oog te verliezen dat de bepaling van deze aktiviteit in maximale omstandigheden wordt uitgevoerd. De gegevens van figuur 54 hebben dan ook slechts een vergelijkende waarde en geven geen beeld van de werkelijke proteolyse in de vis. Deze hangt af van een reeks factoren zoals temperatuur, pH, aanwezigheid van inhibitoren enz. die determinerend zijn voor het verloop van de enzymatische reakties.

Voor al de pH zal hier beperkend optreden. Uit figuur 55 blijkt dat de katheptische aktiviteit bij pH 6,2-gemiddelde begin-pH van doornhaai (zie 4.2.2.14.) slechts ongeveer 20 % van de maximale waarde bedraagt. Men kan dan ook aannemen dat de kathepsinen enkel in het begin van de bewaarperiode van doornhaai een zekere rol in de proteolyse kunnen spelen.

- Neutrale endopeptidasen (figuur 56).

Voor de neutrale endopeptidasen wordt een ander beeld bekomen. De 2de dag wordt slechts een verwaarloosbaar kleine aktiviteit waargenomen. Dit is echter vanaf de 5de dag het geval niet meer. Dat tijdens deze periode geen neutrale endopeptidasen werkzaam zijn wordt bewezen door de twee kurven van figuur 55 (deze twee kurven werden gekozen omdat zij ongeveer dezelfde maximale waarden nl. 338 en $340 \mu\text{g tyr/h/g}$ hebben). Kurve 1 heeft betrekking op doornhaai van de 2de dag (\varnothing niet geslachtsrijp, winter) en bereikt bij pH 7,5 nog slechts een zeer kleine waarde ($\pm 10 \mu\text{g}$). Kurve 2 echter, die betrekking heeft op vis van de 9de dag (\varnothing geslachtsrijp, lente) vertoont bij pH 7,5 een schoudervorming en bereikt slechts bij pH ± 10

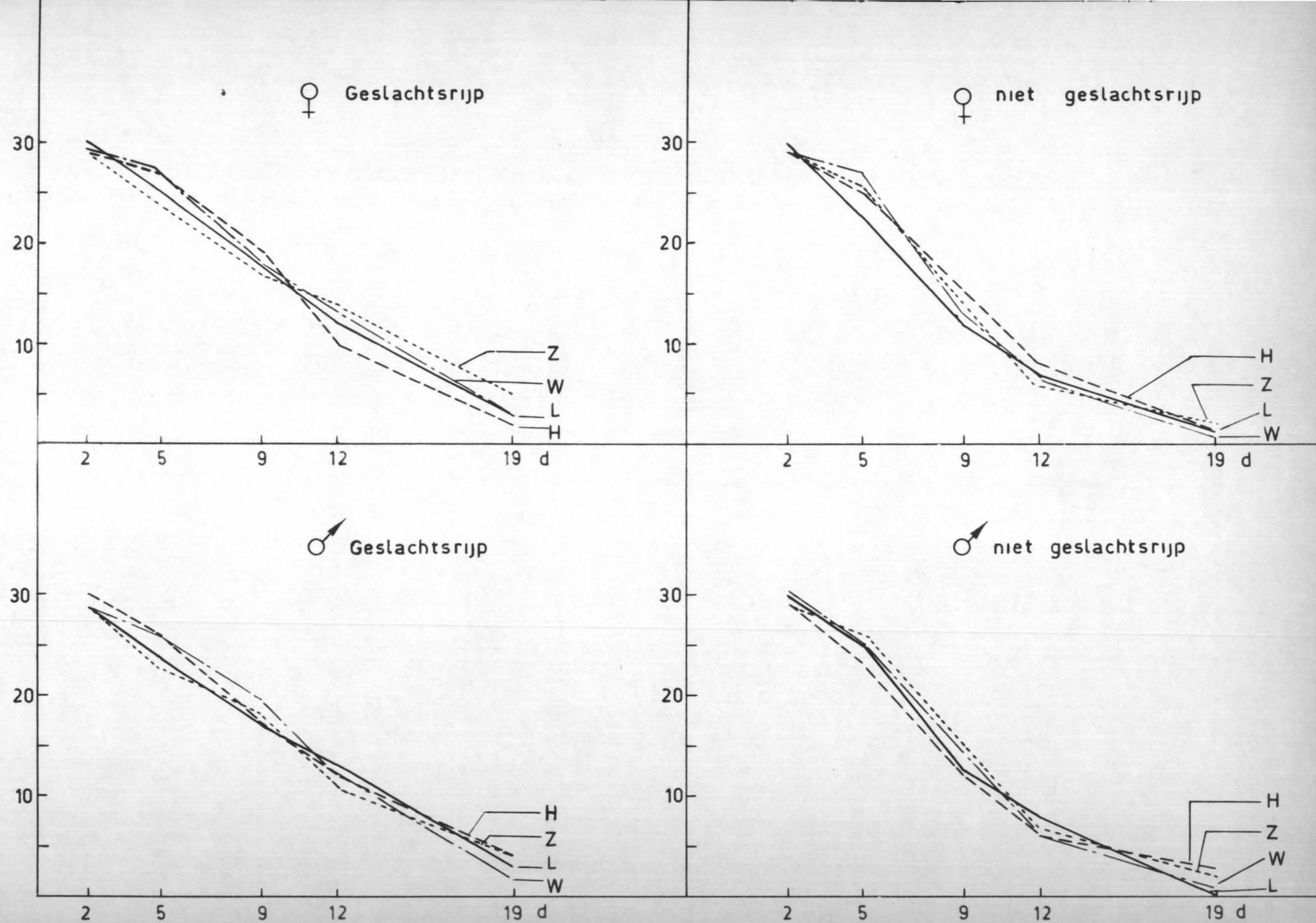


Fig. 57-Verloop van de kwoteringen van de organoleptische keuring in *S. acanthias* tijdens het bewaren.

dezelfde lage waarde, hetgeen erop wijst dat in dit geval neutrale endopeptidasen actief zijn.

Vanaf de 5de dag neemt de aktiviteit snel toe om na 19 dagen waarden van 180 tot 265 $\mu\text{g tyr/h/g}$ te bereiken bij de geslachtsrijpe dieren. Bij de kleine doornhaaien is deze stijging nog sterker en bereikt na 19 dagen 270 tot 380 $\mu\text{g tyr/h/g}$. Evenmin als bij de kathepsinen wordt hier een invloed van het seizoen of van het geslacht waargenomen. Op te merken valt dat de aktiviteit van de neutrale endopeptidasen slechts ongeveer de helft van deze van de kathepsinen bereikt.

Siebert (1958) stelde voorop dat de neutrale endopeptidasen in vis uitsluitend van bakteriële oorsprong zijn. Voor doornhaai zijn er sterke aanwijzingen dat dit werkelijk zo is. Inderdaad, het begin van de aktiviteit van deze enzymen (5de dag) valt samen met de periode waarop algemeen aangenomen wordt dat de bakteriële aktie duidelijk wordt (zie 1.2.3.2.). Daarenboven is deze proteolytische aktiviteit sterker bij kleine individuen ; uit de resultaten van de meeste andere bepalingen (ammoniak, VRS, pH, enz.) en de organoleptische keuring, blijkt duidelijk dat deze vissen sneller bederven ; de bakteriële aktiviteit is dan ook logischerwijze sterker.

4.2.2.17. Organoleptische keuring (figuur 57, tabel A41).

Tot en met de vijfde dag krijgen de vier visgroepen ongeveer dezelfde kwotering.

Vanaf de negende dag echter wordt voor de kleine dieren een duidelijk lagere waarde bekomen, nl. gemiddeld 13,5 t.o.v. 17,8.

De organoleptische keuring bevestigt aldus de resultaten van de diverse laboratoriumanalyses nl. dat niet geslachtsrijpe doorn-

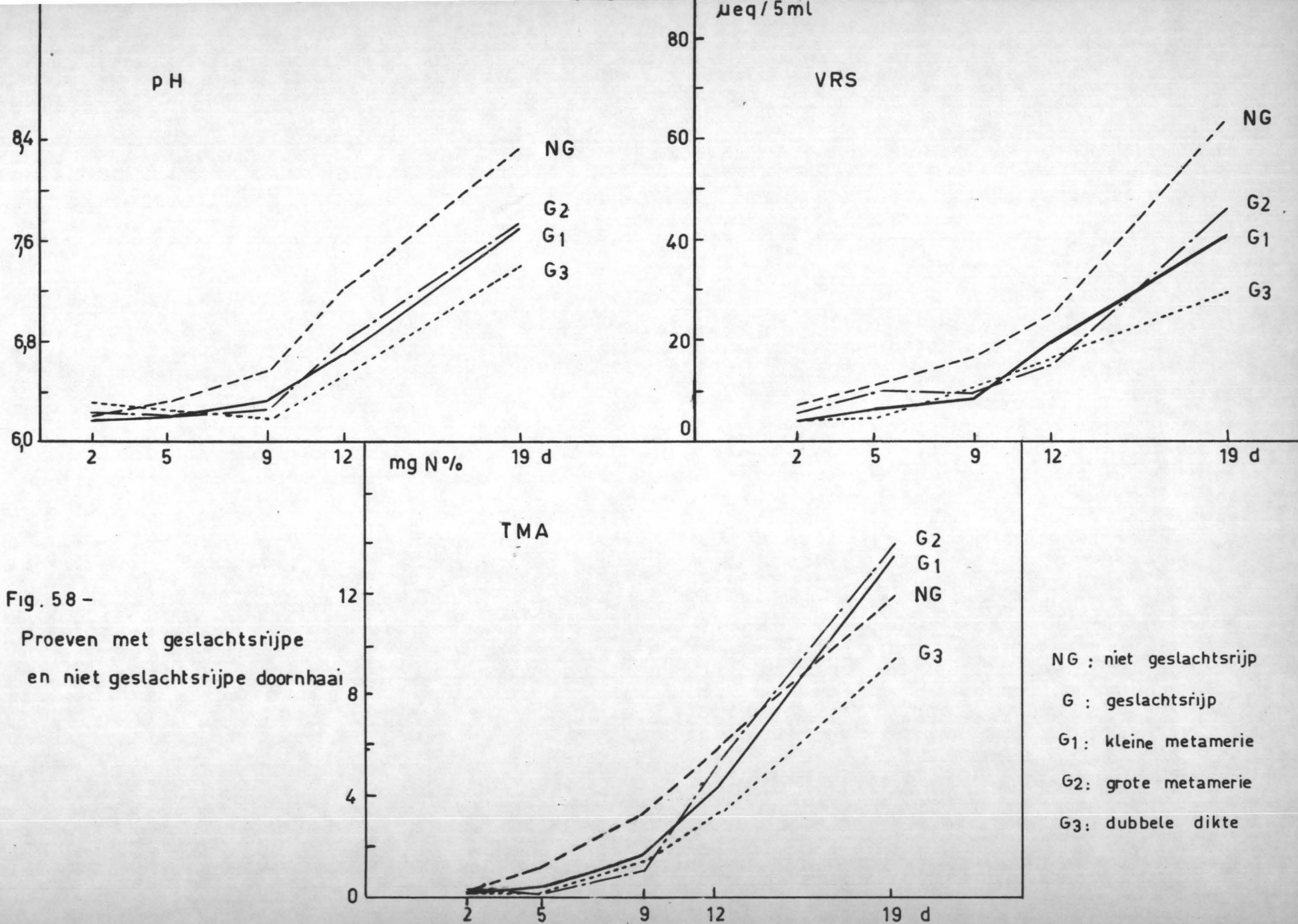


Fig. 58 -

Proeven met geslachtsrijpe
en niet geslachtsrijpe doornhaai

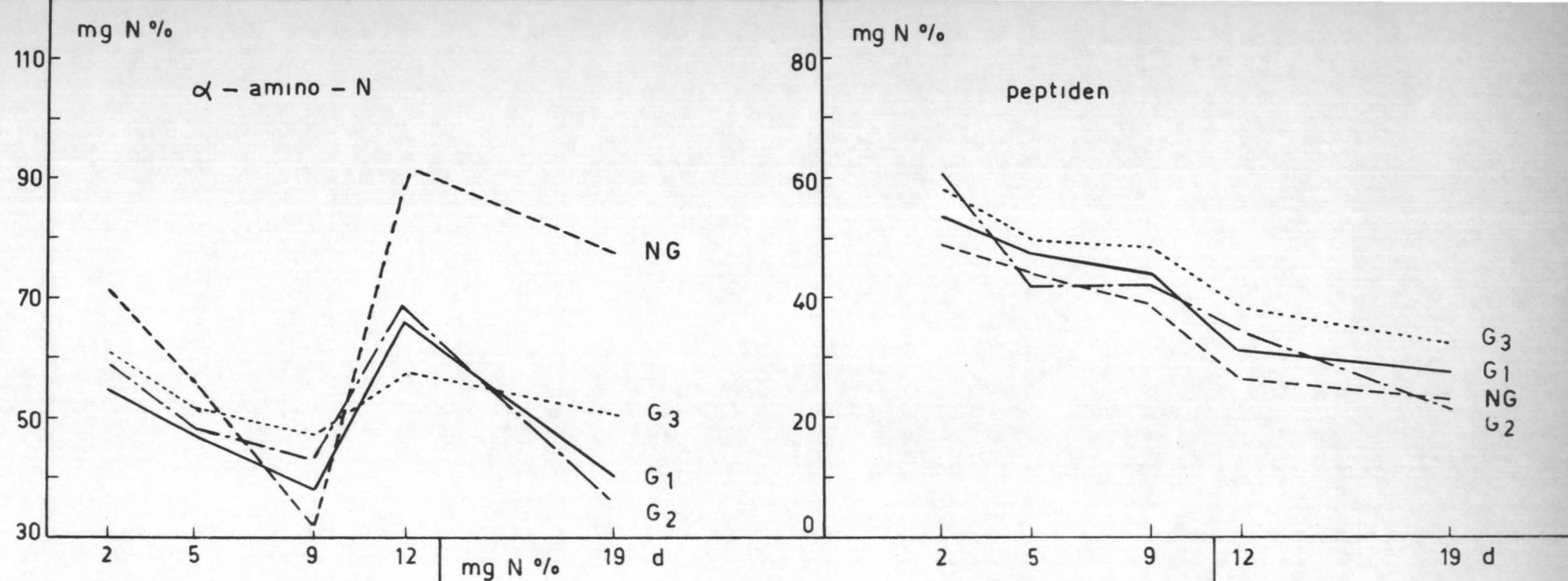
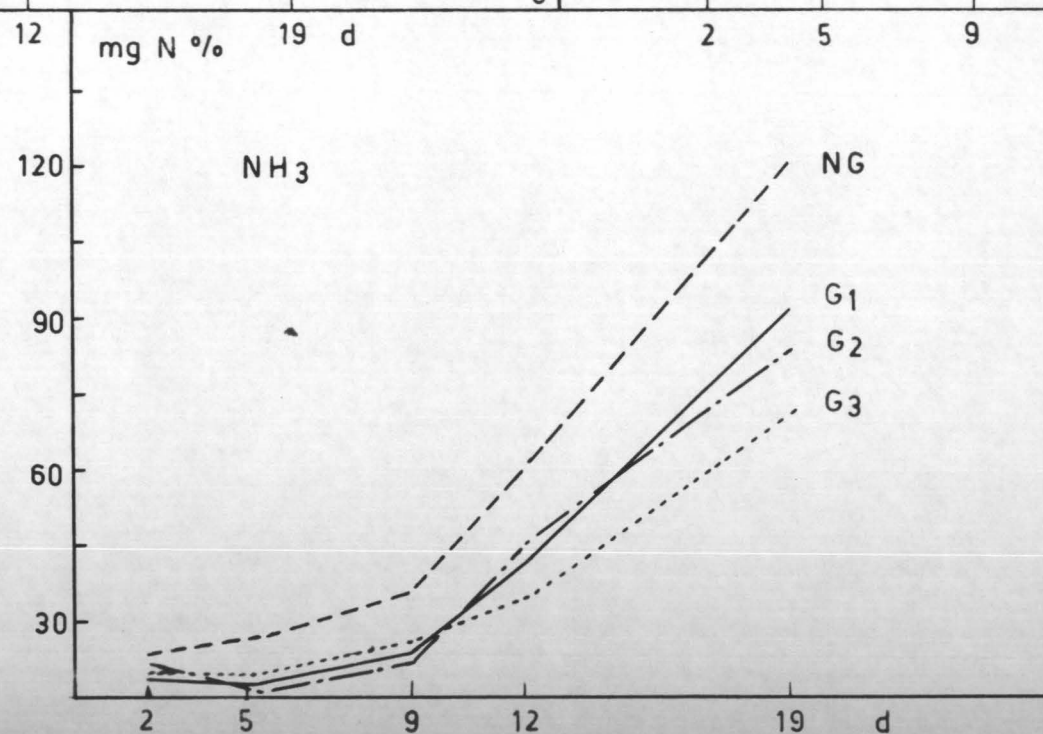


Fig. 58 - (vervolg)



haaien vlugger bederven. Het onderscheid in bederfsnelheid komt echter bij de laboratoriumanalyses reeds vanaf de 5de dag tot uiting, hetgeen erop wijst dat deze methoden gevoeliger zijn om de eerste verschijnselen van een kwaliteitsachteruitgang aan te duiden.

4.2.3. Aanvullende proeven met geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe doornhaaien.

De gegevens van tabel A42 en figuur 58 bevestigen de resultaten van de vorige bewaarproeven.

Met uitzondering van TMA en peptiden, geven alle methoden een duidelijk onderscheid tussen geslachtsrijpe (G1) en niet geslachtsrijpe doornhaaien (NG) aan. De waarden van de individuele bepalingen liggen trouwens op hetzelfde niveau als tijdens de vorige proeven.

Kleinere vissen hebben kleinere myotomen, zodat per eenheid van volume meer myocommata voorkomen. Daar deze laatste bindweefsels de dragers zijn van het bloedvaten- en lymfe-systeem, die in doornhaai niet duidelijk gescheiden zijn (Mott 1957), en daar algemeen vooropgesteld wordt dat het indringen van de bacteriën in de eerste plaats langs deze weg geschiedt (Shewan 1961), zou men kunnen aannemen dat om deze reden het bederf van kleinere, niet geslachtsrijpe doornhaaien vlugger geschiedt.

De proef met blokken vis met kleine (G1) en grote myotomen (G2) geeft echter voor geen enkele bepaling een duidelijk onderscheid in bederfsnelheid. De metamerie blijkt aldus zonder invloed te zijn. Men kan hieruit besluiten dat het indringen van bacteriën en de diffusie van bakteriële enzymen, opgeloste substraten en afbraakproducten door de afstand van de myocommata niet worden beïnvloed. Dit indringen moet dan ook voor een belangrijk deel rechtstreeks in de

viscellen van de myotomen gebeuren, zonder daarom noodzakelijkerwijze langs de myocommata te gaan.

Bij niet geslachtsrijpe vissen (NG) treedt een sterkere vermindering van het gehalte aan vrije aminozuren op. Daar het uitlooeffekt wegens de proefomstandigheden (zelfde laagdikte) voor grote en kleine vissen ongeveer gelijk moet zijn wijst dit erop dat de vrije aminozuren in kleine individuen aan sterkere afbraak onderhevig zijn. Men kan dan ook aannemen dat door het hogere gehalte aan vrije aminozuren in niet geslachtsrijpe doornhaaien, de bacteriën een gunstiger voedingsbodem vinden en hierdoor een vlugger en intenser bederf veroorzaken. Verschillende argumenten pleiten hier trouwens voor.

Fruton en Simmonds (1961) wijzen erop dat vele bacteriën niet in staat zijn proteïnasen in het kultuurmedium vrij te stellen. Deze organismen hebben daarom gemakkelijk diffundeerbare stikstofbronnen (ammoniak, aminozuren, lagere peptiden) nodig voor hun ontwikkeling.

Recent werk op rundvlees (Jay en Kontou 1967) toont trouwens aan dat de bederfflora in de eerste plaats de aanwezige laagmoleculaire stikstofverbindingen, eerder dan de eiwitten zelf, verbruikt.

Verder stelden Tomiyama en Kawazoe (1956) vast dat visautolysaten voor de groei van bepaalde bacteriën beter zijn dan de conventionele media.

Jones (1954), Hodgkiss en Jones (1955) en Shewan en Jones (1957) voerden tenslotte vergelijkende proeven met steriele en niet steriele kabeljauw uit en rapporteerden dat er sterke indicaties zijn dat de bacteriën in de beginfase van het bederf bepaalde vrije aminozuren (bv. glutaminezuur en β -alanine) bij voorkeur verbruiken, alhoewel de interpretatie van de resultaten door het uitlooeffekt bemoeilijkt werd.

Dat de grootte zelf van de vis eveneens een rol speelt wordt aangetoond door de resultaten van de proef met blokken van dubbele dikte (3 cm i.p.v. 1,5 cm) (G3), waar het bederf geringer is dan de overeenkomstige blokken met kleinere dikte (G1/G2).

Ook bij TMA wordt dit waargenomen. Dit wijst erop dat naast het feit dat de reductie van TMAO vanaf een pH hoger dan $\pm 7,5$ door de kleinere aktiviteit van het triamineoxydase (biochemische faktor) geremd wordt (kurve NG), de laagdikte (fysische faktor) eveneens een rol speelt. Dit bevestigt de proeven van Wood et al. (1942) die vaststelden dat de bakteriële reductie van TMAO hoofdzakelijk een oppervlakteverschijnsel is, waarbij TMAO en TMA respektievelijk naar en van de oppervlakte diffunderen, zodat de dikte van de aan bederf onderhevige laag hierbij determinerend is.

Daar de waarnemingen voor pH, ammoniak en VRS analoog zijn, kan men aannemen dat de andere bederfverschijnselen eveneens hoofdzakelijk aan de oppervlakte plaatsgrijpen.

Uit deze aanvullende proeven kan worden besloten dat het bederf van kleine, niet geslachtsrijpe doornhaai vlugger geschiedt door het hoger gehalte aan vrije aminozuren en door de kleinere dikte.

4.3. Besluiten.

De bewaarproeven van *S. acanthias* in ijs toonden in de eerste plaats aan dat aanzienlijke hoeveelheden extraheerbare stikstofverbindingen door het smeltwater worden uitgeloozd. Zo wordt de evolutie van het gehalte aan ureum, TMAO en creatine tijdens de bewaring praktisch uitsluitend door het uitlooeffect bepaald.

Verder duiden de organoleptische keuring en de meeste bepalingen aan dat kleine, niet geslachtsrijpe doornhaaien vlugger bederven dan grote geslachtsrijpe individuen. Er kon worden aangetoond dat dit te wijten is aan twee factoren, nl. (a) de kleinere laagdikte en het groter relatief oppervlak, waardoor de bakteriën vlugger gans het visvlees kunnen besmetten en de uitwisseling van de af te breken substraten en de gevormde bederfprodukten gemakkelijker geschiedt en (b) het hoger gehalte aan vrije aminozuren dat een gunstiger voedingsbodem voor de mikro-organismen vormt.

HOOFDSTUK 5 - DE OBJEKTIEVE KWALITEITSBEPALING VAN DOORNHAAI.

Om gebruikt te kunnen worden voor de objektieve kwaliteitsbepaling moet een methode zoveel mogelijk aan volgende criteria beantwoorden :

- er moet een goede korrelatie met de organoleptische keuring bestaan,
- tijdens het bederf moeten de waarden zonder grote schommelingen, ofwel voortdurend stijgen, ofwel voortdurend dalen ; dit moet toelaten met een redelijke betrouwbaarheid kwaliteitsgrenzen te bepalen,
- de reproduceerbaarheid moet voldoende zijn,
- ook tijdens de eerste fazen van het bederf moet de gevoeligheid bevredigend zijn,
- de uitvoering van de test moet relatief eenvoudig kunnen geschieden en weinig tijd in beslag nemen.

Wanneer men de verschillende methoden die in vorig hoofdstuk werden besproken overloopt, dan stelt men vast dat vooral NH_3 , VRS, pH en -mits enkele beperkingen - TMA en elektrische weerstand aan deze criteria vrij goed beantwoorden.

Daar de bekomen gemiddelde kurven voor NH_3 , VRS, pH en TMA een zeer analoog verloop kennen (figuren 20, 51, 52 en 23) werd nagegaan of zij aan een gemeenschappelijke funktie beantwoorden.

Hiervoor werden eerst de algemene gemiddelden berekend. Tabel 13 geeft deze waarden, die betrekking hebben op 24 proefnemingen, weer.

Tabel 13 - Gemiddelde waarden voor ammoniak, VRS, pH en TMA.

Geslachtsrijp					
	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>15 d</u>
NH ₃ (mgN%)	20,1	23,1	27,2	44,4	100,5
VRS (μ eq/5 ml)	5,9	7,2	9,8	19,0	44,9
pH	6,21	6,27	6,34	6,80	7,86
TMA (mgN%)	0,1	0,7	2,3	4,4	14,1
Niet geslachtsrijp					
	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>15 d</u>
NH ₃ (mgN%)	19,9	27,8	37,4	65,5	135,6
VRS (μ eq/5 ml)	6,5	9,9	17,2	28,6	54,7
pH	6,22	6,34	6,61	7,08	8,29
TMA (mgN%)	0,2	2,1	4,1	6,6	13,9

Vervolgens dienden alle resultaten procentueel uitgedrukt te worden ten einde onderling te kunnen worden vergeleken. Hiervoor werden de gemiddelde waarden van de 2de en van de 19de dag respectievelijk op 0 en op 100 % gesteld. Van alle gegevens werd eerst de beginwaarde afgetrokken waarna met de gepaste koëfficiënt werd vermenigvuldigd. Deze werd als volgt berekend :

$$\frac{100}{\text{waarde na 19 d} - \text{waarde na 2 d}}$$

waarde na 19 d - waarde na 2 d

Volgende transformaties werden aldus ingevoerd :

Geslachtsrijpe doornhaaien :

$$\text{Procentuele ammoniakwaarden} = (\text{NH}_3 - 20,1) \cdot 1,24$$

$$\text{Procentuele VRS-waarden} = (\text{VRS} - 5,9) \cdot 2,56$$

Procentuele pH-waarden = $(\text{pH} - 6,21) \cdot 60,6$

Procentuele TMA-waarden = $(\text{TMA} - 0,1) \cdot 7,14$

Niet geslachtsrijpe doornhaaien :

Procentuele ammoniakwaarden = $(\text{NH}_3 - 19,9) \cdot 0,86$

Procentuele VRS-waarden = $(\text{VRS} - 6,5) \cdot 2,07$

Procentuele pH-waarden = $(\text{pH} - 6,22) \cdot 48,3$

Procentuele TMA-waarden = $(\text{TMA} - 0,2) \cdot 7,29$

De procentuele waarden werden in tabel 14 opgenomen.

Tabel 14 - Procentuele gemiddelde waarden voor ammoniak, VRS, pH en TMA.

Geslachtsrijp					
	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
NH ₃	0	3,7	8,8	30,1	100
VRS	0	3,3	10,0	33,5	100
pH	0	3,6	7,9	35,8	100
TMA	0	4,2	15,8	30,0	100
Niet geslachtsrijp					
	<u>2 d</u>	<u>5 d</u>	<u>9 d</u>	<u>12 d</u>	<u>19 d</u>
NH ₃	0	6,8	15,1	39,4	100
VRS	0	7,0	22,1	45,8	100
pH	0	5,8	18,8	41,5	100
TMA	0	13,5	28,0	46,6	100

Tabel 14 geeft een duidelijk beeld van de goede analogie tussen de vier bepalingen (TMA bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien uitgezonderd).

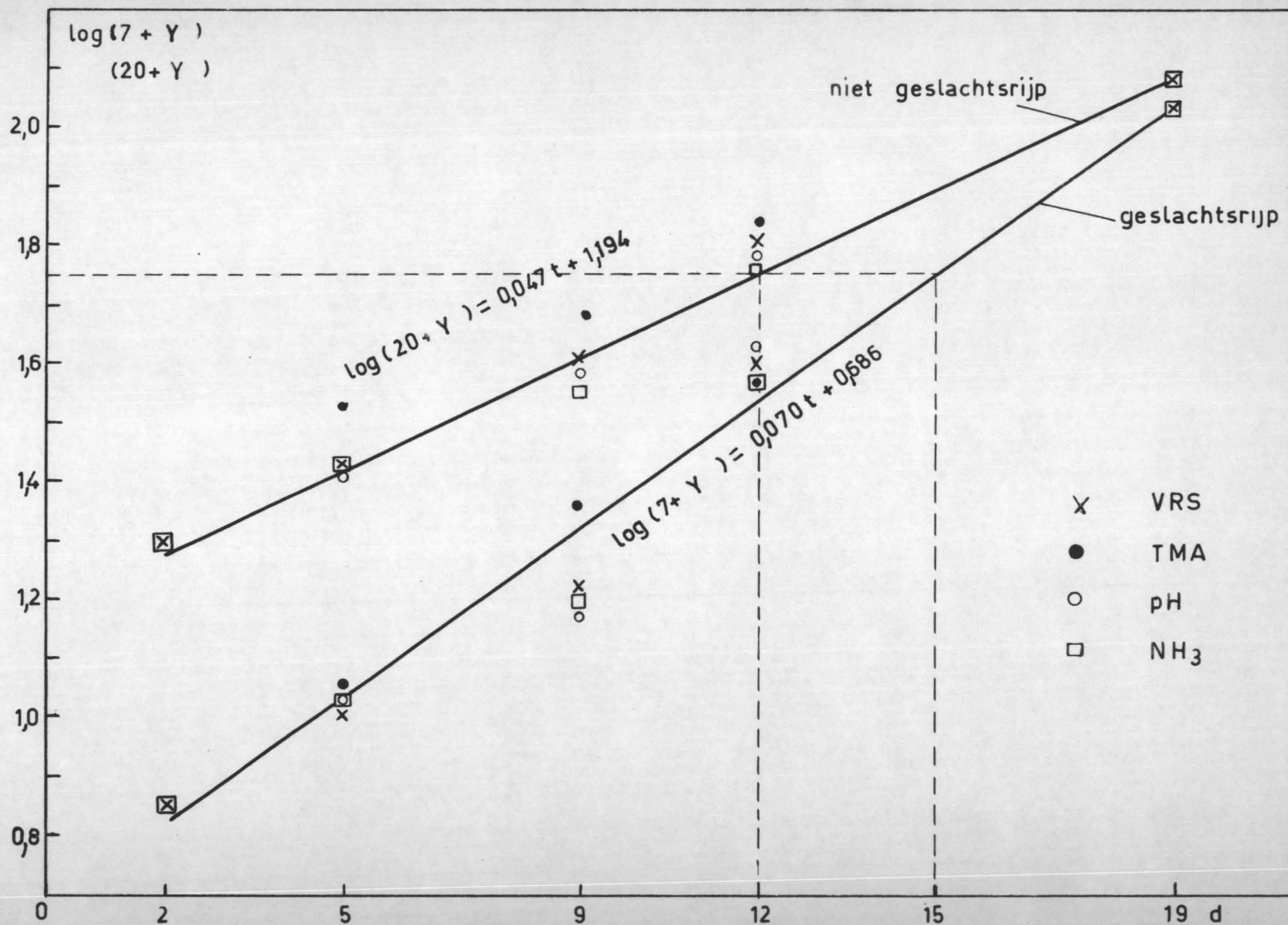


Fig. 59 - LOGARITMISCH VERBAND TUSSEN VRS, TMA, pH en NH₃

Tenslotte werd de gemeenschappelijke functie bepaald. Er werd hierbij vastgesteld dat het verloop van de vier bederfwaarden met een goede benadering semi-logaritmisch is, op voorwaarde dat een konstante aan de resultaten wordt toegevoegd.

Voor geslachtsrijpe doornhaaien werd aldus gevonden dat volgende functie rechtlijnig verloopt :

$$\log (7 + Y)$$

waarbij Y de procentuele NH_3 -, VRS-, pH- en TMA-waarden voorstelt.

De regressielijn, berekend met de methode van de kleinste kwadraten, beantwoordt aan : $\log (7 + Y) = 0,070 t + 0,686$, waarbij t het aantal dagen voorstelt. Deze functie werd in figuur 59 grafisch uitgezet.

De vier methoden volgen aldus ongeveer hetzelfde bederfpatroon en evolueren vrijwel op dezelfde wijze. Enkel de 9de dag wordt voor VRS, NH_3 en pH een ietwat sterkere afwijking genoteerd. Daar dit voor TMA niet wordt vastgesteld, wijst dit erop dat deze verbinding voor geslachtsrijpe doornhaaien gevoeliger is.

Voor de kleine individuen bleek een analoge functie geldig te zijn, maar een hogere konstante diende ingevoerd te worden :

$$\log (20 + Y)$$

De regressielijn is dan ook verschillend :

$$\log (20 + Y) = 0,047 t + 1,194$$

Het sneller bederf van deze doornhaaien komt aldus door de hogere konstante en de gewijzigde richtingskoëfficiënt duidelijk tot uiting (figuur 59).

In tegenstelling met de grote vissen komt TMA niet meer met NH_3 , pH en VRS overeen. Dit is te wijten aan het feit dat de vorming van TMA, zoals in 4.2.2.3. besproken, vanaf de 12de dag sterk wordt geremd. Deze stikstofbase kan dan ook moeilijk voor de objektieve kwaliteitsbepaling van niet geslachtsrijpe doornhaai worden gebruikt.

De elektrische weerstand blijkt vooral geschikt om het bederf in de eerste fazen van de bewaarperiode te volgen. Zoals reeds in 4.2.2.15. vermeld, is de gevoeligheid bij lage Q-waarden sterk verminderd. Daarenboven blijkt de methode talrijke bijkomende nadelen te bezitten, waarvan de voornaamste zijn : (a) onmogelijkheid de meting op ontvelde vis uit te voeren, (b) grote gevoeligheid voor kneuzingen, uitdroging en invloed van elektrolyten (bv. sporen zeewater). Deze nadelen werden reeds tijdens bederfstudies op andere vissoorten vastgesteld (Vyncke 1967).

Van de vrije aminozuren zijn tyrosine en lysine als aanvullende objektieve kwaliteitsbepalingen nuttig omdat ze de eerste duidelijke tekens van kwaliteitsafname aanduiden door het feit dat ze in pas gevangen doornhaai praktisch niet voorkomen.

Vrij methionine en ornithine kunnen eveneens waardevol zijn, zelfs als kwalitatieve bepalingen, daar deze aminozuren pas op het einde van de bewaarperiode voorkomen en aldus de nabijheid van de grens van bederf aangeven.

De organoleptische keuring toonde aan dat bij ongeveer 8 punten op 30 de vis vrijwel bedorven is. Wanneer men deze kwotering

met de andere bepalingen vergelijkt, worden bij benadering volgende grenzen bekomen :

- ammoniak : 60 mg N %
- TMA (geslachtsrijpe doornhaaien) : 9 mg N %
- VRS : 30 μ eq/5 ml
- pH : 7,2
- elektrische weerstand : $Q = 15$

Voor de hier beschreven proefomstandigheden komt dit overeen met een bewaarduur van respectievelijk 15 en 12 dagen voor de geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe doornhaaien. De organoleptische keuring toonde aan dat deze grenzen zowel voor kleine als voor grote vissen gelden. Dit komt trouwens duidelijk tot uiting in figuur 59 waar respectievelijk 15 en 12 dagen met dezelfde logaritmische waarde, nl. 1,75, overeenkomen.

SAMENVATTING EN BESLUITEN.

=====

In dit proefschrift werd eerst nagegaan hoe de voornaamste biologische factoren, nl. geslacht, geslachtsrijpheid (ouderdom), seizoen en voeding het gehalte aan de voornaamste extraheerbare stikstofverbindingen in pas gevangen doornhaai beïnvloeden en welke variatie hierbij voorkomt.

De voeding van *S. acanthias* van het Zuidelijk deel van de Noordzee blijkt niet door het seizoen beïnvloed te worden. Evenmin is tussen wijfjes en mannetjes of tussen geslachtsrijpe en niet geslachtsrijpe vissen een onderscheid vast te stellen. Vis vormt het voornaamste voedsel, met een overwicht *Ammodytidae* (smelt en zandspiering). Opmerkenswaardig is echter het feit dat in 49 % van de gevallen lege magen werden aangetroffen.

Uit de vastgestelde maaginhoud kon besloten worden dat de significante verschillen die bij diverse verbindingen werden waargenomen, in ieder geval niet door een gewijzigde voeding veroorzaakt zijn.

De kleine, niet geslachtsrijpe doornhaaien bevatten significant meer α -aminostikstof, α -alanine, glutaminezuur, glycine en hebben een sterkere kathepsinenactiviteit.

Deze hogere waarden zijn noch aan de voeding, noch aan de osmotische druk te wijten, maar aan het feit dat de meeste aminozuren aan het eiwitmetabolisme deelnemen. In een jong organisme is de groei intenser zodat meer vrije α -aminozuren voorkomen.

Het peptidengehalte wordt daarentegen door het seizoen beïnvloed : in de lente-zomer-periode is het gehalte hoger dan in de

herfst-winter-periode. Het verschillend gedrag van de peptiden en van de vrije aminozuren wijst erop dat de biochemische reacties die tot de vorming van beide groepen verbindingen leiden, niet op dezelfde wijze worden beïnvloed. Overige extraheerbare stikstofverbindingen blijken noch door het geslacht, noch door de geslachtsrijpheid, noch door het seizoen te worden beïnvloed.

In verband met de vrije aminozuren onderscheidt *S. acanthias* zich van de meeste beenvissen door (a) hoge gehalten aan glycine, leucine, cysteïne, cystine, proline, hydroxyproline en sarcosine, (b) het weinig of niet voorkomen van lysine en histidine.

In geen enkel geval worden volgende vrije aminozuren waargenomen: methionine, tyrosine, tryptofaan, ornithine en - zoals vermeld - histidine. Evenmin worden anserine, carnosine en l-methylhistidine gedetekteerd, hetgeen in tegenstelling is met wat voor de meeste beenvissen wordt waargenomen.

Tenslotte worden bij het droge stof- en het totaal stikstofgehalte geen significante verschillen vastgesteld. De doornhaai blijkt in dit verband sterk af te wijken van de meeste andere vissoorten, waar wel duidelijke seizoeninvloeden te bespeuren vallen.

De redenen hiervoor zijn dat er in de voeding geen seizoenverschillen te noteren zijn en dat de geslachtscyclus uitzonderlijk lang is (48 maanden) zodat deze minder van het organisme vergt.

Vervolgens werd tijdens bewaarproeven in ijs bestudeerd hoe de vastgestelde verschillen in samenstelling van pas gevangen *S. acanthias* door de vermelde biologische factoren veroorzaakt, de evolutie van de extraheerbare stikstofverbindingen en de snelheid van bederf van de vis beïnvloeden.

Ten einde de invloed van het spoeleffect van het smeltwater van het ijs na te gaan werd eerst een reeks uitloogproeven uitgevoerd. Hieruit bleek dat het spoeleffect voor praktisch alle proeven gedurende de eerste negen dagen het sterkst is. Aanzienlijke hoeveelheden stikstofbestanddelen worden tijdens deze periode uitgeloogd.

Er kon worden aangetoond dat het verloop van diverse verbindingen o.m. ureum, TMAO, creatine, tijdens het bewaren, bijna uitsluitend door het spoeleffect bepaald wordt en niet door de biochemische afbraak.

De meeste proeven toonden aan dat de kleine, niet geslachtsrijpe doornhaaien vlugger bederven dan de grote, geslachtsrijpe individuen. Verschillen in bederfsnelheid te wijten aan het geslacht of het seizoen werden echter niet waargenomen.

Door de ureumafbraak worden grote hoeveelheden ammoniak gevormd ; nl. respektievelijk gemiddeld 101 en 136 mg N % bij grote en kleine vissen.

Niettegenstaande de hogere TMAO-gehalten blijft het gehalte aan TMA relatief laag. Verder werd vastgesteld dat bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien het TMA-gehalte van de 5de tot de 12de dag vlugger oploopt dan bij geslachtsrijpe vissen. De 19de dag echter worden ongeveer dezelfde hoeveelheden aangetroffen, zodat vanaf de 12de dag een duidelijke remming van de TMA-vorming voorkomt, te wijten aan een inhiberende werking van de hogere pH.

Het α -amino-gehalte kent een sinusoidaal verloop : afwisselend dalend, stijgend en opnieuw dalend. Bij de kleine doornhaaien zijn deze dalingen en stijgingen meer uitgesproken.

Er kon hierbij worden aangetoond dat de afbraak van de α -amino-verbindingen bij deze kategorie vroeger begint en intenser doorgaat. Het verloop van α -alanine, arginine, fenylalanine, glutaminezuur, glycine, leucine en threonine komt vrij goed met dit van α -aminoovereen.

Het verloop van β -alanine en asparaginezuur is onregelmatig maar wijst eerder op een relatief konstant gehalte.

Sarcosine en taurine, die niet in eiwitten voorkomen, kennen een algemeen dalend verloop, hoofdzakelijk te wijten aan het uitlogen.

Tyrosine en lysine worden pas vanaf de 5de dag waargenomen en stijgen dan relatief vlug.

Methionine verschijnt pas in kleine concentraties (1 tot 5 mg %) de 12de dag bij de geslachtsrijpe en de 9de dag bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien. Dit gehalte ondergaat weinig veranderingen tijdens de daarop volgende bewaarperioden.

Ornithine wordt enkel vanaf de 9de dag bij de vier visgroepen waargenomen. Het gehalte toont verder geen duidelijke lijn en schommelt tussen 2 en 7 mg %.

Serine en valine verdwijnen reeds vanaf de 5de dag hetgeen erop wijst dat de afbraakreacties van deze aminozuren sterker doorgaan dan de vormingsreacties.

Van histidine wordt slechts in enkele gevallen sporen aangetroffen. Vrij histidine komt aldus én in pas gevangen doornhaai én tijdens het bewaren van deze vis praktisch niet voor, hetgeen volledig in tegenstelling met de meeste beenvissen is.

Bij proline wordt een algemene concentratievermindering vastgesteld. Deze vermindering is echter tussen de 2de en de 5de dag het sterkst, en is hoofdzakelijk te wijten aan het uitlooeffect.

Hydroxyproline vertoont een ander beeld. In het begin van de bewaarperiode wordt een daling waargenomen, hoofdzakelijk aan het spoeleffect te wijten. Nadien treedt echter een vermeerdering van de concentratie op, te wijten aan de steeds meer doorgedreven degradatie van de bindweefsels waarin dit iminozuur praktisch uitsluitend voorkomt.

Cysteïne vertoont eerst eveneens een daling, gevolgd door een regelmatige stijging, hetgeen erop wijst dat de reacties die leiden tot het vrijstellen en/of de vorming van cysteïne sterker dan de afbraakreacties zijn. Cystine daarentegen vertoont een eerder vlak verloop. Waterstofsulfide, het typische afbraakprodukt van cysteïne, wordt enkel op het einde van de bewaarperiode waargenomen, wanneer het midden meer anaëroob geworden is.

Choline en betaine verlopen zeer onregelmatig.

De vluchtige reducerende stoffen vertonen gedurende de eerste 9 dagen slechts een matige stijging. Daarna echter gaat de concentratie zeer vlug omhoog. Bij de niet geslachtsrijpe doornhaaien wordt een hoger gehalte bereikt dat noch aan ammoniak noch aan TMA, maar aan andere vluchtige reducerende verbindingen (vluchtige zuren, aldehyden, ketonen, enz.) te wijten is.

De pH stijgt relatief vlug en bereikt na 19 d hogere waarden dan in beenvissen (8,28 t.o.v. 6,90). De reden hiervoor is het vrijkomen van grote hoeveelheden ammoniak.

De elektrische weerstand daalt gevoelig de eerste vijf dagen, hetgeen erop wijst dat de dielektrische eigenschappen van de celmembranen vanaf het begin van de bewaarperiode vlug veranderen. De verdere daling is dan minder sterk.

De aktiviteit van de kathepsinen blijkt een algemeen stijgende tendens te vertonen. Daar de optimale pH 4,5 bedraagt, kan men aan nemen dat de kathepsinen enkel in het begin van de bewaarperiode een zekere rol in de proteolyse kunnen spelen.

De neutrale endopeptidasen worden pas vanaf de 5de dag werkzaam en de aktiviteit stijgt van dan af vlug. Deze endopeptidasen zijn van bakteriële oorsprong.

Uit aanvullende proeven met kleine en grote doornhaaien kon aangetoond worden dat de kleine individuen wegens twee redenen vlugger bederven : (a) het hoger begingehalte aan vrije aminozuren, dat een gunstiger voedingsbodem voor de mikro-organismen vormt, (b) de kleinere laagdikte en groter relatief oppervlak die het indringen van de mikro-organismen vergemakkelijken en daarenboven de diffusie van de substraten en afbraakstoffen bespoedigen.

De metamerie van de visspieren blijkt hierbij geen invloed te hebben.

Tenslotte werd onderzocht welke bepalingen voor de objektieve kwaliteitsbepaling van *S. acanthias* kunnen gebruikt worden. Uit de resultaten van de organoleptische keuringen blijkt dat vooral ammoniak, VRS, pH, en elektrische weerstand in aanmerking komen. Voor geslachtsrijpe individuen kan TMA ook gebruikt worden. Ammoniak, VRS, pH en TMA blijken daarenboven met een goede benadering aan dezelfde semi-logaritmische funktie te beantwoorden.

De elektrische weerstand blijkt vooral geschikt om het bederf in de eerste fazen van de bewaarperiode te volgen.

Van de vrije aminozuren zijn tyrosine en lysine als aanvullende objektieve kwaliteitsbepalingen nuttig omdat ze de eerste duidelijke tekens van kwaliteitsafname aanduiden door het feit dat ze in pas gevangen doornhaai praktisch niet voorkomen.

Vrij methionine en ornithine kunnen eveneens waardevol zijn, zelfs als kwalitatieve bepalingen, daar deze aminozuren pas op het einde van de bewaarperiode voorkomen en aldus de nabijheid van de grens van bederf aangeven.

LITERATUUR

=====

- AASEN, O. (1961) : Fiskets Gang 47, 36.
- ACKERMAN, C. en SALMON, W. (1960) : Anal. Biochem. 1, 330.
- ANSON, M. (1938) : J. Gen. Physiol. 22, 79.
- ANTONACOPOULOS, N. (1960) : Z. Lebensmitt.-Untersuch. 113, 113.
- A.O.A.C. (1960) : Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 9de Uitg., A.O.A.C., Washington.
- ARAKAKI, J. en SUYAMA, M. (1966) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 32, 74.
- AWAPARA, J. (1948) : Arch. Biochem. 19, 172.
- BAILEY, B., KORAN, P. en BRADLEY, H. (1942) : Biol. Bull. 83, 129.
- BALDWIN, E. (1960) : Dynamic Aspects of Biochemistry, 3de Uitg., University Press, Cambridge en Comp. Biochem. Physiol. 1, 24.
- BAKER, J. en CHAYKIN, S. (1960) : Biochim. Biophys. Acta 41, 548.
- BAKER, J. en CHAYKIN, S. (1962) : J. Biol. Chem. 237, 1.309.
- BAKER, J., STRUEMLER, A. en CHAYKIN, S. (1963) : Biochim. Biophys. Acta 71, 58.
- BANKS, A. (1955) : J. Sci. Food Agric. 6, 282.
- BARNES, E. en INGRAM, M. (1955) : J. Sci. Food Agric. 6, 448.
- BAUER, E. (1960) : A Statistical Manual for Chemists, Academic Press, New York.
- BEATTY, S. en GIBBONS, N. (1937) : J. Biol. Bd. Can. 3, 77.
- BEATTY, S. (1938) : J. Fish. Res. Bd. Can. 4, 63.
- BEATTY, S. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can. 4, 229.
- BEATTY, S. en COLLINS, V. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can. 4, 412.
- BENOIT, G. en NORRIS, E. (1945) : J. Biol. Chem. 158, 439.
- BERGER, H. (1959) : Aminoacidurie und Hyperaminoacidurie, Karger-Verlag, Basel.
- BERGMAN, M. en LOXLEY, R. (1963) : Anal. Chem. 35, 1961.
- BERMAN, M. (1967) : J. Food Sci. 32, 568.
- BIGELOW, H. en SCHROEDER, W. (1948) : Memoirs of Sears Foundation for Marine Research, Yale University, 1, 455.

- BILINSKI, E. (1962) : J. Fish. Res. Bd. Can. 19, 505.
- BILINSKI, E. (1964) : J. Fish. Res. Bd. Can. 21, 765.
- BLANE, P., BERTRAND, P., de SAQUI-SAMES, G. en LESCURE, R. (1965) : Chim. Anal. 47, 285.
- BLOCK, R., DURRUM, E. en ZWEIG, G. (1958) : A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2de uitg., Academic Press, New York.
- BLOMFIELD, J. en FARRARD, J. (1964) : Anal. Chem. 36, 950.
- BONDIVENNE, R. en BUSCH, N. (1967) : J. Chromatog. 29, 349.
- BONHAM, K., SANFORD, F., CLEGG, W. en BUCHER, G. (1949) : State of Washington, Dep. Fish., Biol. Rep. 49A, 83.
- BONHAM, K. (1954) : Fish. Res. Pap. St. Wash. 1 (2), 25.
- BRAMSTEDT, F. (1957) : Arch. Fishereiwiss. 8, 94.
- BRAMSTEDT, F. (1962) : in : Fish in Nutrition, uitg. E. Heen en R. Kreuzer (FAO, Rome), Fishing News (Books), London.
- BRAMSTEDT, F. (1963) : Z. Ernährungswiss., Supplementa, 51.
- BREGOFF, H., ROBERTS, E. en DELWICHE, C. (1953) : J. Biol. Chem. 205, 565.
- BRENNER, M., OWADES, J. en GOLYZNIAK, R. (1953) : Proc. Amer. Soc. Brew. Chem. 83.
- BROWN, G. jr. (1964) : in : Taxonomic Biochemistry and Serology, uitg. C. Leone, Ronald Press, New York.
- BRUNS, H. (1909) : Arch. Hyg. 67, 209.
- BYSTEDT, J., SWENNE, L. en AAS, H. (1959) : J. Sci. Food Agric. 6, 301.
- CAMPBELL, L. en WILLIAMS, O. (1951) : J. Bacteriol. 62, 249.
- CAMPBELL, J. (1961) : Arch. Biochem. Biophys. 93, 448.
- CARRUTHERS, A., OLDFIELD, J. en TEAGUE, H. (1960) : Analyst 85, 272.
- CASTELL, C., ANDERSON en PIVNIC (1948) : J. Fish. Res. Bd. Can. 7, 370.
- CASTELL, C. en SNOW, J. (1949) : J. Fish. Res. Bd. Can. 7, 561.
- CASTELL, C. en SNOW, J. (1951) : J. Fish. Res. Bd. Can. 8, 195.
- CHARLOT, G. (1961) : Dosages colorimétriques des éléments minéraux, 2de Uitg., Masson, Paris.
- CHATWIN, B. en FORRESTER, C. (1953) : Prog. Rep. Pacif. Cst. Stns., Fish. Res. Bd. Can. No. 95, 35.

- CLAYTON, C. en STEELE, B. (1967) : Clin. Chem. 13, 49.
- CONNELL, J. (1957) : J. Sci. Food Agric. 8, 701.
- CONWAY, E. (1962) : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 5de Uitg., Crosby Lockwood & Son, London.
- CUTTING, C. (1953) : J. Sci. Food Agric. 4, 597.
- de KONING, A. en PAPENDORF, D. (1965) : Fishing Industry Research Institute, South Africa, 19th Ann. Rep. 77.
- DOWDEN, H. (1938) : Biochem. J. 32, 455.
- DUBIN, D. (1960) : J. Biol. Chem. 235, 783.
- DYER, W. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 351.
- DYER, W. en MOUNSEY, Y. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 359.
- DYER, W., DYER, F. en SNOW, M. (1946) : J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 403.
- DYER, F. (1947) : J. Fish. Res. Bd. Can. 7, 128.
- DYER, F. en WOOD, A. (1947) : J. Fish. Res. Bd. Can. 7, 17.
- DYER, W. (1952) : J. Fish. Res. Bd. Can. 8, 314.
- EDDY, B. (1953) : Nature 171, 573.
- ELLIOTT, R. (1952) : Food Research 17, 225.
- F.A.O. (1968) : Yearbook of Fishery Statistics, F.A.O., Rome.
- FARBER, L. en FERRO, M. (1956) : Food Technol. 10, 303.
- FARBER, L. (1965) : in : Fish as Food, Vol. 4, deel 2, Uitg. G. Borgstrom, Academic Press, New York.
- FARRIS, D. (1958) : J. Cons. Int. Explor. Mer 23, 235.
- FERNANDEZ, A. en HENRY, R. (1965) : Anal. Biochem. 11, 190.
- FLORKIN, M. (1956) : 6. Colloq. Ges. Physiol. Chemie, Springer-Verlag, Berlin, p. 62.
- FOLIN, O. (1922) : J. Biol. Chem. 51, 377.
- FOLIN, O. en CIOCALTEV, V. (1927) : J. Biol. Chem. 73, 627.
- FORDL, E. (1921) : J. mar. biol. Ass. U.K., 12, 468.
- FORSTER, R. (1967) : in : Sharks, skates and rays, uitg. P. Gilbert, R. Mathewson en D. Rall, The Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A..
- FRASER, L. (1946) : Trans. R. Soc. Can., Ser. 3, 40, 33.
- FRUTON, J. en SIMMONDS, S. (1961) : General Biochemistry, 2de Uitg., J. Wiley & Sons, New York.
- GAITONDE, M. (1967) : Biochem. J. 104, 627.

- GLICK, D. (1944) : J. Biol. Chem. 156, 643.
- GOLDSTEIN, L. (1967) : in : Sharks, skates and rays, Uitg. P. Gilbert, R. Mathewson en D. Rall, The Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A.
- GORIN, G. en CHIN, C. (1966) : Anal. Biochem. 17, 49.
- HALLMANN, L. (1960) : Klinische Chemie und Mikroskopie, 9de Uitg., Thieme, Stuttgart.
- HARTLEY, H. (1950) : Biometrika 37, 308.
- HASHIMOTO, Y. en OKAICHI, T. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 640.
- HASHIMOTO, Y. en OKAICHI, T. (1958 b) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 645.
- HAYWARD, H. en STADTMAN, T. (1959) : J. Bacteriol. 78, 557.
- HEISS, R. (1954) : Kältetechnik 6, 183.
- HENDERICKX, H. (1961) : Arch. Int. Physiol. Biochim. 69, 449.
- HENNINGS, C. (1963) : Z. Lebensmitt.-Untersuch. 119, 461.
- HICKLING, C. (1930) : J. mar. biol. ass. U.K. 16, 529.
- HODGKISS, W. en JONES, N. (1955) : Biochem. J. 61, iv.
- HOLDEN, M. en MEADOWS, P. (1962) : J. mar. biol. ass. U.K. 42, 179.
- HOLDEN, M. en MEADOWS, P. (1964) : J. Cons. Int. Explor. Mer 28, 418.
- HOLDEN, M. (1965) : The Stocks of Spurdogs (*Squalus acanthias* L.) in British waters, and their migrations, Fishery Investigations Leaflet Series II, 24, 4, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- HOLDEN, M. (1966) : J. Cons. int. Explor. Mer 30, 255.
- HÖRHAMMER, L., WAGNER, H. en KELGER, F. (1963) : Der Deutsche Apotheker 15, 164.
- HUGHES, R. (1958) : Nature 181, 1.281.
- HUGHES, R. (1959) : J. Sci. Food Agric. 8, 431 en 10, 558.
- HUGHES, R. (1960) : J. Sci. Food Agric. 11, 700.
- HUGHES, R. (1961) : J. Sci. Food Agric. 12, 475.
- HUNTER, A. en DAUPHINEE, J. (1924) : Proc. Roy. Soc. Ser. B (97), 227.
- ICES Oceanographic Data Lists (1966) : Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer, Charlottenlund Slot - Denemarken.
- International Code of Zoological Nomenclature (1961) : International Commission on Zoological Nomenclature, London.

- ITO, K. (1959) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 25, 658.
- JACOBS, H. en HOFFMAN, W. (1931) : J. Biol. Chem. 93, 685.
- JAY, J. en KONTOU, K. (1967) : Appl. Microbiol. 15, 759.
- JENSEN, A. (1966) : Fishery Bulletin 65, 527.
- JONES, N. (1954) : Biochem. J. 58, XLVII.
- JONES, N. (1955) : Biochem. J. 60, 81.
- JONES, N. (1956) : Biochem. J. 64, 20P.
- JONES, N. (1959) : J. Sci. Food Agric. 10, 282.
- JONES, N. (1959 b) : Biochem. J. 72, 407.
- JONES, N. (1962) : in : Recent Advances in Food Science, Uitg. J. Hawthorn en J. Muil Leitch, Butterworths, London.
- KISTIAKOWSKY, G., MANGELSDORF, P., ROSENBERG, A. en SHAW, W. (1952) : J. Am. Chem. Soc. 74, 5.015.
- KONOSU, S., OZAY, M. en HASHIMOTO, Y. (1964) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 30, 930.
- KREBBS, H. (1937) : Biochem. J. 31, 2.095.
- KUNITZ, M. (1947) : J. Gen. Physiol. 30, 291.
- LEUTHARDT, F. (1963) : Lehrbuch der Physiologischen Chemie, W. De Gruyter & Co, Berlin.
- LIM, F. en SCHALL, E. (1964) : J. of A.O.A.C. 47, 501.
- LISTON, J. (1965) : in : The Technology of Fish Utilization, Uitg. R. Kreuzer (FAO Rome), Fishing News (Books), London.
- LOVE, R. (1955) : J. Sci. Food Agric. 6, 30.
- LOVE, R. (1960) : Nature 185, 692.
- LOVERN, J. (1962) : in : Fish in Nutrition, Uitg. E. Heen en R. Kreuzer (FAO, Rome), Fishing News (Books), London.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, J., FARR, L. en RANDALL, J. (1951) : J. Biol. Chem. 193, 265.
- LÜCKE, F. en E. FRERCKS, E. (1940) : Vorratspflege u. Lebensmittel-forsch. 3, 130.
- LUYPEN, A. (1959) : De invloed van het kaken op de rijping van gezouten maatjesharing, Thesis, Schotanus & Jens, Utrecht.
- LUKTON, A. (1958) : Nature 182, 1.019.
- LUKTON, A. en OLCOTT, H. (1958) : Food Res. 23, 611.
- MALTSCHESKY, N. en PARTMANN, W. (1950) : Arch. f. Mikrobiol. 16, 252.

- MESSER, M. (1961) : Anal. Biochem. 2, 353.
- McDONALD, C. en CHEN, L. (1965) : Anal. Biochem. 10, 175.
- McLEAN, N. en CASTELL, C. (1956) : J. Fish. Res. Bd. Can. 13, 861.
- MISERICORDIA, F. (1954) : Atti della Soc. It. delle Sci. Vet. 8, 441.
- MOTT, J. (1957) : in : Physiology of Fishes, Vol. 1, Uitg. M. Brown, Academic Press, New York.
- MOYER, R., SOUTHCOTT, B., BAKER, E. en TARR, H. (1959) : J. Fish. Res. Bd. Can. 16, 791.
- NEILANDS, J. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 368.
- NEUMAN, R. en LOGAN, M. (1950) : J. Biol. Chem. 184, 299.
- NORRIS, E. en BENOIT, G. (1945) : J. Biol. Chem. 158, 433.
- OGILVIE, J. en WARREN, A. (1957) : Can. J. Zool. 35, 735.
- OKAICHI, T., MANABE, M. en HASHIMOTO, Y. (1959) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 25, 136.
- PARTMANN, W. (1951) : Z. Lebensmitt.-Untersuch. 93, 341.
- PARTMANN, W. (1952) : Arch. Fischereiwiss., Jahresband 1952/53, 40.
- PARTMANN, W. (1965) : Zool. Jb. Physiol. 71, 261.
- PARTMANN, W. (1966) : Z. Lebensmitt.-Untersuch. 129, 205.
- PATAKI, G. (1966) : Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, W. De Gruyter & Co. Berlin.
- POPE, C. en STEVENS, M. (1939) : Biochem. J. 33, 1.070.
- PROCTOR, B., NICKERSON, J. en GOLDBLITH, S. (1950) : Refrig. Eng. 59, 375.
- RANKE, B. (1955) : Arch. Fischereiwiss. 6, 109.
- RANKE, B. (1959) : Arch. Fischereiwiss. 10, 117.
- RANKE, E. (1960) : Arch. Fischereiwiss. 11, 18.
- RATNER, S. (1944) : J. Biol. Chem. 152, 119.
- REAY, G., CUTTING, C. en SHEWAN, J. (1943) : J. Soc. Chem. Ind. (London) 62, 77.
- RONOLD, O. en JAKOBSEN, F. (1947) : J. Soc. Chem. Ind. 66, 160.
- SAKAGUCHI, M. en SIMIDU, W. (1964) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 30, 1.003.
- SAKAGUCHI, M. en SIMIDU, W. (1965) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 31, 72.

- SAITO, K. en SAMESHIMA, M. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 201.
- SATO, S. (1935) : J. Fac. Sci. Sapporo, ser. 6, Zool. 4 (3), 127.
- SCHAEFER, H. (1959) : Dtsch. Hydrogr. Z., Erg. Hft. Reihe B, 3, 103.
- SCHAEFER, H. (1961) : Rapp. et Proc.-Verb. Cons. Int. Explor. Mer 149, 167.
- SCHAEFER, H. (1962) : Helgol. Wiss. Meeresunter. 8, 257.
- SCHAEFER, H. (1962 b) : Helgol. Wiss. Meeresunters. 8, 280.
- SCHAEFER, H. (1963) : Helgol. Wiss. Meeresunters. 8, 383.
- SCHILLING, E., BURCHILL, P. en CLAYTON, R. (1963) : Anal. Biochem. 5, 1.
- SCHMITT, A., SIEBERT, G. en BOTTKE, I. (1966) : Arch. Fischereiwiss. 17, 50.
- SELIGSON, D. en SELIGSON, H. (1951) : J. Lab. & Clin. Med. 38, 324.
- SEVERIN, S. en VUL'FSON, P. (1959) : Biochemistry 24, 923.
- SHAW, W. (1954) : J. Am. Chem. Soc. 76, 2.160.
- SHEWAN, J. (1949) : J. Roy. Sanit. Inst. 59, 394.
- SHEWAN, J. (1951) : Biochem. Soc. Symp. 6, 28.
- SHEWAN, J. (1953) : J. Sci. Food Agric. 4, 565.
- SHEWAN, J. (1955) : J. Sci. Food Agric. 6, 99.
- SHEWAN, J. en JONES, N. (1957) : J. Sci. Food Agric. 8, 491.
- SHEWAN, J. (1961) : in : Fish as Food, Vol. I, Uitg. G. Borgström, Academic Press, New York.
- SHEWAN, J. (1962) : in : Recent Advances in Food Science, Uitg. J. Hawthorn and J. Muil Leitch, Butterworths, London.
- SHIEH, H. (1964) : J. Microbiol. 10, 837 en 11, 375.
- SHIEH, H. (1966) : Can. J. Microbiol. 12, 299.
- SIEBERT, G. (1957) : Arch. Fischereiwiss. 1 Beiheft, 43.
- SIEBERT, G. (1958) : Experientia 14, 65.
- SIEBERT, G., SCHMITT, A. en BOTTKE, I. (1964) : Arch. Fischereiwiss. 15, 233.
- SIEBERT, G., SCHMITT, A. en VAN MALORTIE, R. (1965) : Z. Physiol. Chem. 342, 20.
- SIMIDU, W. en OISI, K. (1951) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 16, 547.
- SIMIDU, W. en OISI, K. (1951 b) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 16, 423.

- SIMIDU, W. en OISI, K. (1951 c) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 17, 38.
- SIMIDU, W. en HIBIKI, S. (1953) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 19, 19.
- SIMIDU, U., TERASHIMA, H. en SIMIDU, W. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 586.
- SIMIDU, W. (1961) : in : Fish as Food, Vol. 1, Uitg. G. Borgstrøm, Academic Press, New York.
- SIVADJIAN, J. (1931) : J. Pharm. Chim. 13, 528.
- SNEDECOR, G. (1962) : Statistical Methods, 5de Uitg., The Iowa State University Press, Iowa, U.S.A.
- SOLOWAY, S. en STETTEN, D. jr. (1953) : J. Biol. Chem. 204, 207.
- SOUDAN, F. (1965) : La Conservation par le Froid des Poissons, Crustacés et Mollusques, J.B. Baillière et Fils, Paris.
- SOUTHCOTT, B., MOYER, R., BAKER, E. en TARR, H. (1960) : J. Fish. Res. Bd. Can. 17, 811.
- SPINELLI, J. (1964) : Fish. Ind. Res. 2 (3), 17.
- STAHL, E. (1967) : Dünnschichtchromatographie, 2de Uitg., Springer Verlag, Berlin.
- STANSBY, M., KUDO, G. en HALL, A. (1968) : Food Technol. 22, 107.
- STEGEMANN, H. (1958) : Z. Physiol. Chem. 311, 41.
- STETTEN, M. (1951) : J. Biol. Chem. 189, 499.
- SUWA, A. (1909) : Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 128, 421 en 129, 231.
- SUYAMA, M., TOKUHIRO, T. en SUYAMA, Y. (1950) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 16, 211.
- SUYAMA, M. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 267, 271, 276.
- TAKADA, K. en NISHIMOTO, J. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 636.
- TAKADA, K. en NISHIMOTO, J. (1958 b) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 632.
- TALLAN, H., MOORE, S. en STEIN, W. (1954) : J. Biol. Chem. 211, 927.
- TARR, H. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can. 4, 367.
- TARR, H. (1940) : J. Fish. Res. Bd. Can. 5, 187.
- TARR, H. (1941) : J. Fish. Res. Bd. Can. 5, 211.
- TEMPLEMAN, W. (1944) : Res. Bull. Div. Fish. Res. Newfoundland 15, 102.
- THORNLEY, M. (1960) : J. appl. Bact. 23, 37.

- TOMIYAMA, T. en KAWAZOE, A. (1956) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 21, 1.226.
- TROLL, W. en LINDSLEY, J. (1955) : J. Biol. Chem. 215, 655.
- VAISEY, E. (1956) : Can. J. Biochem. Physiol., 34, 1.085.
- VAN SLYKE, D. (1911) : J. Biol. Chem. 9, 185.
- VON ARX, E. en NEHER, R. (1963) : J. Chromatog. 12, 329.
- VUL'FSON, P. (1961) : Biochemistry 26, 271.
- VYNCKE, W. en MERLEVEDE, E. (1963) : Arch. Belg. Méd. Soc. Hyg. 21, 147.
- VYNCKE, W. (1964) : De objektieve kwaliteitsbepaling van vis, Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij, Oostende, publikatie 5.
- VYNCKE, W. (1966) : De bepaling van de vluchtige reducerende stoffen als objektieve kwaliteitsmethode voor vis, Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij, Oostende, publikatie 11.
- VYNCKE, W. (1967) : Fish. News Int. 6, 39.
- VYNCKE, W. (1968) : Fish. News Int. 7, 49.
- VYNCKE, W. (1968 b) : Lab. Pract. 17, 813.
- WANG, J. en TARR, D. (1955) : J. Am. Chem. Soc. 77, 6.205.
- WATSON, D. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can. 4, 252 en 267.
- WILLSTATTER, R. en BAUMANN, E. (1928) : Z. Physiol. Chem. 180, 127.
- WITTFOGEL, H. en GEBHARDT, R. (1957) : Arch. of Lebensm. Hyg. 8, 241 en 270.
- WITTFOGEL, H. (1962) : in : Sanitary Regulations for Fish and Fish Products, OECD, Paris.
- WOOD, A., SIGURDSSON, G. en DYER, W. (1942) : J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 53.
- WREN, J. en WIGGALL, P. (1965) : Biochem. J. 94, 216.
- WRONSKI, M. (1966) : Chemia analit. 11, 799 (Anal. Abstr. 14, 6895, 1967).
- ZACHARIUS, R. en TALLEY, E. (1962) : J. Chromatog. 7, 51.

AANHANGSEL

Tabellen A1 - A42

Tabel A1 - Ureumgehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
Gemiddelde	<u>1965</u> 1920	<u>1965</u> 1872	<u>1966</u> 1906	<u>1966</u> 1885
Spreidingsbreedte	1664 - 2175	1702 - 2195	1615 - 2065	1655 - 2008
Standaardafwijking	160	155	141	111
Gemiddelde	<u>1966</u> 1869	<u>1966</u> 1933	<u>1967</u> 1908	<u>1967</u> 1925
Spreidingsbreedte	1602 - 1955	1684 - 2180	1619 - 2110	1710 - 2187
Standaardafwijking	123	155	154	150
Gemiddelde	<u>1967</u> 1894	<u>1967</u> 1919	<u>1968</u> 1895	<u>1968</u> 1877
Spreidingsbreedte	1636 - 2138	1610 - 2095	1643 - 2108	1604 - 1992
Standaardafwijking	157	152	146	122
Algemeen gemiddelde	1894	1908	1903	1895
	0 niet geslachtsrijp +			
Gemiddelde	<u>1965</u> 1935	<u>1965</u> 1906	<u>1966</u> 1878	<u>1966</u> 1890
Spreidingsbreedte	1705 - 2180	1612 - 2068	1630 - 2102	1631 - 2002
Standaardafwijking	149	143	148	116
Gemiddelde	<u>1966</u> 1870	<u>1966</u> 1911	<u>1967</u> 1904	<u>1967</u> 1888
Spreidingsbreedte	1611 - 1997	1666 - 2131	1644 - 2112	1603 - 2019
Standaardafwijking	121	146	147	130
Gemiddelde	<u>1967</u> 1904	<u>1967</u> 1930	<u>1968</u> 1882	<u>1968</u> 1916
Spreidingsbreedte	1622 - 2147	1705 - 2194	1608 - 2005	1656 - 2156
Standaardafwijking	165	153	124	157
Algemeen gemiddelde	1903	1915	1888	1898

Tabel A1 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	1873	1881	1917	1892
Spreidingsbreedte	1641 - 2111	1608 - 2195	1750 - 2185	1604 - 2189
Standaardafwijking	147	184	136	183
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	1949	1904	1886	1901
Spreidingsbreedte	1766 - 2133	1681 - 2184	1642 - 2112	1604 - 2159
Standaardafwijking	115	158	147	174
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	1897	1919	1865	1886
Spreidingsbreedte	1654 - 2191	1658 - 2106	1619 - 2155	1610 - 2115
Standaardafwijking	168	140	168	158
Algemeen gemiddelde	1906	1901	1889	1893
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	1823	1899	1923	1867
Spreidingsbreedte	1640 - 2130	1623 - 2195	1620 - 2176	1613 - 2150
Standaardafwijking	154	179	174	168
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	1861	1871	1902	1860
Spreidingsbreedte	1602 - 2152	1625 - 2145	1610 - 2151	1623 - 2104
Standaardafwijking	172	163	170	151
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	1884	1876	1870	1854
Spreidingsbreedte	1615 - 2156	1631 - 2185	1608 - 2195	1639 - 2157
Standaardafwijking	170	174	184	162
Algemeen gemiddelde	1856	1882	1898	1860

Tabel A2 - Vrij ammoniakgehalte in *S. acanthias* (in mg N %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 + geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	26,3	10,4	24,3	15,4
Spreidingsbreedte	11,3 - 28,8	6,0 - 25,1	15,2 - 27,6	10,0 - 25,3
Standaardafwijking	5,5	6,0	3,9	4,8
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	14,0	27,7	17,7	26,3
Spreidingsbreedte	9,8 - 29,8	10,6 - 28,1	9,8 - 23,7	12,2 - 28,1
Standaardafwijking	6,3	5,5	4,4	5,0
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	24,5	19,6	20,0	14,5
Spreidingsbreedte	9,9 - 24,2	11,3 - 32,0	9,5 - 29,2	8,7 - 24,6
Standaardafwijking	4,5	6,5	6,2	5,0
Algemeen gemiddelde	21,6	19,2	20,7	18,7
	0 + niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	13,5	18,1	25,5	20,5
Spreidingsbreedte	6,3 - 29,5	10,5 - 27,7	12,1 - 31,2	10,9 - 26,2
Standaardafwijking	7,3	5,4	6,0	4,8
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	26,1	12,2	15,4	19,6
Spreidingsbreedte	12,3 - 33,0	7,0 - 31,2	8,7 - 22,7	10,1 - 28,8
Standaardafwijking	6,5	7,6	4,4	5,9
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	21,9	27,1	10,8	20,6
Spreidingsbreedte	10,2 - 27,7	9,3 - 32,2	6,0 - 27,0	10,5 - 29,6
Standaardafwijking	5,5	7,2	6,6	6,0
Algemeen gemiddelde	20,5	19,1	17,2	20,2

Tabel A2 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	23,2	19,4	12,7	10,8
Spreidingsbreedte	10,1 - 24,7	12,0 - 32,0	10,5 - 22,6	8,1 - 21,4
Standaardafwijking	4,6	6,3	3,8	4,2
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	15,5	11,4	26,6	25,9
Spreidingsbreedte	10,5 - 29,9	8,1 - 17,6	11,5 - 24,5	13,0 - 27,3
Standaardafwijking	6,1	3,0	4,1	4,5
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	22,3	27,6	27,0	18,4
Spreidingsbreedte	12,1 - 28,6	14,5 - 25,6	15,1 - 25,1	10,5 - 24,2
Standaardafwijking	5,2	3,5	3,2	4,3
Algemeen gemiddelde	20,3	19,5	22,1	18,4
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	12,5	15,2	25,6	18,1
Spreidingsbreedte	8,2 - 25,7	9,1 - 29,1	10,2 - 35,9	9,0 - 31,9
Standaardafwijking	5,5	6,3	8,1	7,2
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	24,2	20,9	13,2	27,0
Spreidingsbreedte	10,5 - 32,7	7,2 - 34,2	6,5 - 25,9	10,5 - 28,9
Standaardafwijking	7,0	8,5	6,1	5,8
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	14,4	24,3	22,4	12,5
Spreidingsbreedte	9,4 - 33,6	11,2 - 34,7	7,6 - 31,5	6,8 - 29,0
Standaardafwijking	7,6	7,4	7,5	7,0
Algemeen gemiddelde	17,0	20,1	20,4	19,2

Tabel A3 - TMAO-gehalte in *S. acanthias* (mg N %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	191	204	202	182
Spreidingsbreedte	143 - 220	153 - 244	180 - 266	146 - 209
Standaardafwijking	24	28	27	19
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	175	210	205	199
Spreidingsbreedte	132 - 217	179 - 237	180 - 277	157 - 232
Standaardafwijking	26	18	30	23
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	225	189	208	211
Spreidingsbreedte	180 - 262	141 - 230	171 - 254	164 - 265
Standaardafwijking	23	28	26	31
Algemeen gemiddelde	197	201	205	197
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	188	193	214	196
Spreidingsbreedte	137 - 225	153 - 240	174 - 269	158 - 241
Standaardafwijking	27	27	30	26
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	220	210	201	185
Spreidingsbreedte	176 - 251	166 - 245	170 - 239	141 - 228
Standaardafwijking	23	24	21	27
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	192	201	223	205
Spreidingsbreedte	159 - 241	162 - 251	189 - 263	157 - 244
Standaardafwijking	25	28	23	27
Algemeen gemiddelde	200	201	212	195

Tabel A3 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	224	186	204	181
Spreidingsbreedte	173 - 265	150 - 232	169 - 255	135 - 218
Standaardafwijking	29	25	27	26
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	210	212	205	190
Spreidingsbreedte	187 - 241	164 - 249	185 - 271	160 - 223
Standaardafwijking	17	26	27	19
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	178	194	209	197
Spreidingsbreedte	144 - 213	158 - 232	173 - 260	151 - 234
Standaardafwijking	21	23	27	26
Algemeen gemiddelde	204	197	206	189
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	195	211	203	184
Spreidingsbreedte	154 - 216	175 - 248	173 - 234	144 - 222
Standaardafwijking	19	22	19	24
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	189	190	209	215
Spreidingsbreedte	143 - 230	145 - 229	189 - 266	172 - 248
Standaardafwijking	27	26	24	23
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	211	202	212	188
Spreidingsbreedte	172 - 262	152 - 236	179 - 268	140 - 224
Standaardafwijking	28	27	28	26
Algemeen gemiddelde	198	201	208	195

Tabel A4 - Vrij creatine-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	509	548	477	526
Spreidingsbreedte	395 - 610	420 - 618	356 - 566	388 - 620
Standaardafwijking	67	62	66	72
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	525	469	511	478
Spreidingsbreedte	401 - 615	318 - 524	322 - 545	344 - 555
Standaardafwijking	67	64	70	66
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	516	489	495	499
Spreidingsbreedte	415 - 620	350 - 560	297 - 537	381 - 576
Standaardafwijking	64	66	75	61
Algemeen gemiddelde	516	502	494	501
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	473	547	502	434
Spreidingsbreedte	365 - 578	345 - 588	311 - 533	294 - 545
Standaardafwijking	66	76	69	78
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	536	522	523	563
Spreidingsbreedte	376 - 614	330 - 560	373 - 599	340 - 584
Standaardafwijking	74	72	71	76
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	519	497	527	488
Spreidingsbreedte	306 - 561	300 - 550	402 - 619	288 - 524
Standaardafwijking	80	78	68	74
Algemeen gemiddelde	509	522	517	495

Tabel A4 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ [↑] geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	435	536	508	545
Spreidingsbreedte	306 - 527	308 - 573	401 - 629	365 - 570
Standaardafwijking	69	83	71	64
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	566	458	573	513
Spreidingsbreedte	399 - 622	284 - 528	311 - 560	389 - 593
Standaardafwijking	70	76	78	64
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	539	496	555	501
Spreidingsbreedte	379 - 625	388 - 617	435 - 627	396 - 607
Standaardafwijking	77	72	60	66
Algemeen gemiddelde	513	496	545	519
	♂ [↑] niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	452	504	476	573
Spreidingsbreedte	264 - 486	350 - 601	305 - 511	422 - 612
Standaardafwijking	69	78	64	59
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	509	554	434	496
Spreidingsbreedte	312 - 555	435 - 649	290 - 542	285 - 539
Standaardafwijking	76	67	79	79
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	527	488	568	475
Spreidingsbreedte	357 - 578	285 - 531	393 - 615	315 - 557
Standaardafwijking	69	77	69	76
Algemeen gemiddelde	496	515	492	514

Tabel A5 - Vrij creatinine-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	66	50	59	58
Spreidingsbreedte	25 - 77	20 - 78	23 - 74	25 - 80
Standaardafwijking	16	18	15	17
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	41	60	51	65
Spreidingsbreedte	18 - 75	29 - 81	22 - 71	26 - 86
Standaardafwijking	18	16	15	19
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	44	49	72	41
Spreidingsbreedte	20 - 69	22 - 74	36 - 82	21 - 69
Standaardafwijking	15	16	14	15
Algemeen gemiddelde	50	53	61	55
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	70	45	59	68
Spreidingsbreedte	25 - 86	20 - 75	22 - 74	29 - 80
Standaardafwijking	19	17	16	15
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	43	57	44	41
Spreidingsbreedte	21 - 79	25 - 82	18 - 76	21 - 72
Standaardafwijking	18	17	18	16
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	51	40	62	48
Spreidingsbreedte	23 - 79	18 - 78	23 - 81	21 - 78
Standaardafwijking	17	19	18	18
Algemeen gemiddelde	55	47	55	52

Tabel A5 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ [↑] geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	43	48	69	42
Spreidingsbreedte	20 - 78	22 - 73	25 - 74	21 - 74
Standaardafwijking	18	16	15	16
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	61	45	50	71
Spreidingsbreedte	23 - 77	19 - 67	22 - 72	21 - 72
Standaardafwijking	17	14	15	16
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	56	64	61	48
Spreidingsbreedte	19 - 70	30 - 78	28 - 80	21 - 78
Standaardafwijking	16	15	16	18
Algemeen gemiddelde	53	52	60	54
	♂ [↑] niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	58	53	40	66
Spreidingsbreedte	20 - 81	22 - 76	19 - 71	23 - 87
Standaardafwijking	19	17	16	20
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	63	42	59	48
Spreidingsbreedte	24 - 80	19 - 72	21 - 71	22 - 76
Standaardafwijking	17	16	15	17
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	44	68	45	55
Spreidingsbreedte	18 - 79	24 - 81	17 - 78	21 - 78
Standaardafwijking	19	18	19	18
Algemeen gemiddelde	55	54	48	56

Tabel A6 - α -aminostikstofgehalte in *S. acanthias* (in mg N %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	72	68	65	71
Spreidingsbreedte	50 - 95	49 - 80	52 - 93	50 - 102
Standaardafwijking	14	10	12	16
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	55	65	73	67
Spreidingsbreedte	31 - 70	35 - 82	53 - 101	39 - 91
Standaardafwijking	12	14	15	16
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	68	65	57	78
Spreidingsbreedte	48 - 92	36 - 85	42 - 79	48 - 99
Standaardafwijking	13	15	11	16
Algemeen gemiddelde	65	66	65	72
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	90	81	77	85
Spreidingsbreedte	71 - 118	62 - 116	62 - 101	56 - 107
Standaardafwijking	14	16	12	16
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	72	78	80	84
Spreidingsbreedte	52 - 98	55 - 108	67 - 127	56 - 104
Standaardafwijking	14	16	18	15
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	82	70	81	80
Spreidingsbreedte	51 - 106	55 - 91	54 - 102	50 - 104
Standaardafwijking	17	11	15	16
Algemeen gemiddelde	81	76	79	83

Tabel A6 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ [↑] geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	67	70	54	65
Spreidingsbreedte	42 - 87	40 - 95	40 - 80	41 - 92
Standaardafwijking	14	17	12	16
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	70	64	58	61
Spreidingsbreedte	52 - 99	36 - 96	39 - 81	42 - 87
Standaardafwijking	14	18	13	14
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	58	66	60	73
Spreidingsbreedte	28 - 73	41 - 90	35 - 81	54 - 109
Standaardafwijking	14	15	14	17
Algemeen gemiddelde	65	66	57	66
	♂ [↑] niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	80	85	74	68
Spreidingsbreedte	61 - 102	65 - 108	50 - 99	41 - 89
Standaardafwijking	12	13	15	15
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	71	82	67	89
Spreidingsbreedte	50 - 101	62 - 115	48 - 85	59 - 124
Standaardafwijking	16	16	11	20
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	75	72	83	81
Spreidingsbreedte	55 - 105	55 - 92	68 - 131	51 - 102
Standaardafwijking	15	11	19	16
Algemeen gemiddelde	75	79	74	79

Tabel A7 - Peptidengehalte in *S. acanthias* (in mg N %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	66	49	50	64
Spreidingsbreedte	32 - 85	39 - 84	35 - 79	30 - 79
Standaardafwijking	16	14	13	15
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	65	54	57	66
Spreidingsbreedte	41 - 81	28 - 82	31 - 79	36 - 83
Standaardafwijking	12	16	15	14
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	70	53	58	62
Spreidingsbreedte	33 - 80	30 - 82	27 - 82	38 - 86
Standaardafwijking	14	16	17	15
Algemeen gemiddelde	67	52	55	64
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	61	47	42	56
Spreidingsbreedte	29 - 81	27 - 67	31 - 82	30 - 74
Standaardafwijking	16	12	15	14
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	56	50	54	63
Spreidingsbreedte	32 - 76	42 - 80	25 - 78	35 - 82
Standaardafwijking	13	11	16	14
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	66	53	48	61
Spreidingsbreedte	33 - 77	38 - 86	30 - 78	28 - 79
Standaardafwijking	13	15	15	16
Algemeen gemiddelde	61	50	48	60

Tabel A7 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ [↑] geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	59	55	59	68
Spreidingsbreedte	35 - 73	31 - 66	40 - 83	38 - 83
Standaardafwijking	12	10	13	14
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	63	47	55	62
Spreidingsbreedte	30 - 78	35 - 67	37 - 77	40 - 82
Standaardafwijking	15	10	12	13
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	67	62	54	65
Spreidingsbreedte	31 - 76	42 - 78	45 - 79	98 - 73
Standaardafwijking	14	11	10	11
Algemeen gemiddelde	63	54	56	65
	♂ [↑] niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	65	60	50	63
Spreidingsbreedte	49 - 82	36 - 85	31 - 74	36 - 79
Standaardafwijking	10	15	13	13
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	63	52	50	66
Spreidingsbreedte	42 - 88	30 - 68	29 - 73	46 - 87
Standaardafwijking	14	11	13	13
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	68	48	56	69
Spreidingsbreedte	44 - 77	29 - 64	26 - 80	39 - 87
Standaardafwijking	13	10	17	15
Algemeen gemiddelde	65	53	52	66

Tabel A8 - Vrij α -alanine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	20	15	25	12
Spreidingsbreedte	5 - 41	7 - 37	10 - 58	6 - 38
Standaardafwijking	11	9	15	10
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	25	35	20	37
Spreidingsbreedte	4 - 42	8 - 65	11 - 38	6 - 62
Standaardafwijking	12	18	8	17
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	22	14	18	16
Spreidingsbreedte	7 - 52	8 - 41	5 - 52	8 - 45
Standaardafwijking	14	10	15	11
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	28	32	22	30
Spreidingsbreedte	9 - 64	5 - 58	12 - 42	7 - 41
Standaardafwijking	17	16	9	11

Tabel A9 - Vrij arginine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	5,1	8,0	6,2	4,9
Spreidingsbreedte	1,0 - 9,6	3,5 - 17,7	1,8 - 15,5	1,1 - 11,5
Standaardafwijking	2,7	4,4	4,3	3,3
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	8,2	10,0	7,1	6,8
Spreidingsbreedte	3,2 - 19,0	5,3 - 21,9	2,4 - 16,8	1,9 - 14,4
Standaardafwijking	5,0	5,2	4,5	3,9
	♂ [↑] geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	7,5	9,2	5,3	6,5
Spreidingsbreedte	1,6 - 19,1	3,5 - 16,3	3,3 - 15,8	2,0 - 12,5
Standaardafwijking	5,5	4,0	3,9	3,3
	♂ [↑] niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	9,5	8,7	9,4	10,1
Spreidingsbreedte	4,8 - 21,6	3,9 - 18,1	4,0 - 16,2	5,1 - 18,5
Standaardafwijking	5,3	4,4	3,8	4,2

Tabel A10 - Vrij asparaginezuur-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	4,1	5,3	6,8	6,5
Spreidingsbreedte	2,5 - 8,9	1,9 - 12,0	1,6 - 15,0	2,4 - 11,6
Standaardafwijking	2,0	3,5	4,2	2,9
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	9,1	6,6	8,8	8,5
Spreidingsbreedte	3,2 - 17,5	4,5 - 11,8	2,0 - 18,2	3,2 - 15,3
Standaardafwijking	4,5	2,3	5,1	3,8
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	5,0	4,7	3,9	6,1
Spreidingsbreedte	2,6 - 15,3	1,9 - 13,0	1,1 - 10,9	2,0 - 14,4
Standaardafwijking	4,0	3,5	3,1	3,9
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	7,3	7,8	6,4	7,1
Spreidingsbreedte	3,1 - 19,3	2,8 - 17,1	2,0 - 16,6	1,0 - 18,2
Standaardafwijking	5,1	4,5	4,6	5,3

Tabel A11 - Vrij fenylalanine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	7,1	10,2	8,5	9,4
Spreidingsbreedte	1,7 - 12,2	0 - 17,8	2,6 - 17,5	3,0 - 15,4
Standaardafwijking	3,5	5,6	4,7	3,9
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	12,5	11,6	7,6	10,4
Spreidingsbreedte	4,1 - 20,9	3,8 - 18,1	1,9 - 14,3	2,5 - 18,1
Standaardafwijking	5,3	4,5	3,9	4,9
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	11,9	12,8	9,1	8,0
Spreidingsbreedte	2,8 - 19,3	1,5 - 21,6	2,5 - 17,8	3,0 - 15,7
Standaardafwijking	5,2	6,3	4,8	4,0
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	7,4	8,8	13,0	11,5
Spreidingsbreedte	0 - 15,9	2,1 - 17,4	2,5 - 22,8	3,2 - 19,7
Standaardafwijking	3,8	4,8	6,4	5,2

Tabel A12 - Vrij glutaminezuur-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	5,9	10,4	12,1	8,6
Spreidingsbreedte	0 - 19,1	1,1 - 24,3	2,4 - 28,0	0 - 27,0
Standaardafwijking	6,0	7,3	8,0	8,5
	♂ niet geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	20,4	15,2	26,9	23,3
Spreidingsbreedte	5,1 - 38,5	3,0 - 32,6	1,9 - 37,8	5,6 - 36,8
Standaardafwijking	10,5	9,3	11,3	9,8
	♂ geslachtsrijp ↗			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	9,1	7,8	6,4	11,7
Spreidingsbreedte	2,2 - 26,0	1,1 - 19,9	0 - 21,6	1,7 - 34,8
Standaardafwijking	7,5	5,9	6,8	10,4
	♂ niet geslachtsrijp ↗			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	28,9	23,4	18,9	21,4
Spreidingsbreedte	6,0 - 39,4	4,7 - 34,6	2,5 - 35,9	5,4 - 33,4
Standaardafwijking	10,5	9,4	10,5	8,8

Tabel A13 - Vrij glycine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	50	58	36	67
Spreidingsbreedte	7 - 99	5 - 119	4 - 83	11 - 106
Standaardafwijking	29	36	25	30
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	61	87	78	107
Spreidingsbreedte	6 - 133	13 - 150	20 - 128	31 - 161
Standaardafwijking	40	43	34	40
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	44	63	52	38
Spreidingsbreedte	6 - 95	10 - 115	3 - 146	4 - 99
Standaardafwijking	28	33	45	30
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	100	90	71	80
Spreidingsbreedte	28 - 152	12 - 177	9 - 123	21 - 129
Standaardafwijking	39	52	36	34

Tabel A14 - Vrij leucine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	36	45	27	31
Spreidingsbreedte	3 - 89	5 - 84	0 - 63	4 - 77
Standaardafwijking	27	25	20	23
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	70	39	55	63
Spreidingsbreedte	12 - 139	3 - 83	6 - 111	19 - 92
Standaardafwijking	40	25	33	23
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	41	25	34	39
Spreidingsbreedte	6 - 69	0 - 70	4 - 96	6 - 108
Standaardafwijking	20	22	29	32
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	67	52	48	57
Spreidingsbreedte	9 - 126	13 - 99	15 - 85	10 - 92
Standaardafwijking	37	27	22	26

Tabel A15 - Vrij serine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	7,4	3,2	6,8	5,3
Spreidingsbreedte	1,2 - 17,7	1,6 - 10,5	0 - 17,8	1,0 - 13,7
Standaardafwijking	5,2	2,8	5,6	4,0
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	4,5	8,2	9,1	7,0
Spreidingsbreedte	0 - 12,1	2,2 - 14,6	2,0 - 19,5	1,8 - 15,5
Standaardafwijking	3,8	3,9	5,5	4,3
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	10,5	7,2	7,1	8,8
Spreidingsbreedte	3,0 - 20,8	1,6 - 14,3	2,0 - 13,8	2,3 - 17,5
Standaardafwijking	5,6	4,0	3,7	4,8
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	9,1	6,1	6,8	4,7
Spreidingsbreedte	3,5 - 17,2	0 - 17,2	1,1 - 18,9	0 - 14,9
Standaardafwijking	4,3	5,4	5,6	4,7

Tabel A16 - Vrij taurine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
<div> <div>0</div> <div>+</div> <div>geslachtsrijp</div> </div>				
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
	Gemiddelde 115	Gemiddelde 86	Gemiddelde 155	Gemiddelde 124
	Spreidingsbreedte 21 - 211	Spreidingsbreedte 16 - 149	Spreidingsbreedte 78 - 277	Spreidingsbreedte 38 - 213
Standaardafwijking	60	42	63	55
<div> <div>0</div> <div>+</div> <div>niet geslachtsrijp</div> </div>				
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
	Gemiddelde 96	Gemiddelde 137	Gemiddelde 128	Gemiddelde 120
	Spreidingsbreedte 20 - 182	Spreidingsbreedte 35 - 236	Spreidingsbreedte 14 - 236	Spreidingsbreedte 41 - 193
Standaardafwijking	51	63	70	48
<div> <div>♂</div> <div>geslachtsrijp</div> </div>				
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
	Gemiddelde 82	Gemiddelde 117	Gemiddelde 109	Gemiddelde 159
	Spreidingsbreedte 14 - 173	Spreidingsbreedte 22 - 232	Spreidingsbreedte 30 - 186	Spreidingsbreedte 50 - 247
Standaardafwijking	50	66	49	62
<div> <div>♂</div> <div>niet geslachtsrijp</div> </div>				
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
	Gemiddelde 123	Gemiddelde 98	Gemiddelde 140	Gemiddelde 116
	Spreidingsbreedte 25 - 228	Spreidingsbreedte 29 - 175	Spreidingsbreedte 47 - 206	Spreidingsbreedte 35 - 172
Standaardafwijking	64	46	50	43

Tabel A17 - Vrij threonine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	12	15	25	16
Spreidingsbreedte	2 - 34	3 - 41	3 - 63	0 - 45
Standaardafwijking	10	12	19	14
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	28	21	14	22
Spreidingsbreedte	8 - 49	4 - 52	3 - 38	2 - 59
Standaardafwijking	13	15	11	18
	0 [↗] geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	13	16	26	10
Spreidingsbreedte	3 - 35	0 - 41	2 - 53	0 - 29
Standaardafwijking	10	13	16	9
	0 [↗] niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	22	20	28	18
Spreidingsbreedte	4 - 58	5 - 43	3 - 60	0 - 48
Standaardafwijking	17	12	18	15

Tabel A18 - Vrij valine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	5,4	2,5	3,8	7,0
Spreidingsbreedte	1,2 - 10,7	0 - 7,0	0 - 13,9	1,5 - 15,8
Standaardafwijking	3,3	2,2	4,4	4,5
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	4,4	5,0	2,9	6,3
Spreidingsbreedte	1,0 - 13,4	2,1 - 13,2	1,5 - 7,9	2,3 - 14,4
Standaardafwijking	3,9	3,5	2,0	3,8
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	5,1	6,5	7,3	4,0
Spreidingsbreedte	0 - 12,7	3,2 - 12,4	2,5 - 13,9	0 - 12,4
Standaardafwijking	4,0	2,9	3,6	3,9
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	6,0	5,2	3,9	4,8
Spreidingsbreedte	2,4 - 10,3	1,1 - 11,6	1,8 - 8,2	0 - 11,1
Standaardafwijking	2,5	3,3	2,0	3,5

Tabel A19 - Vrij sarcosine-gehalte in *S. acanthias* (mg %)

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	37	52	61	45
Spreidingsbreedte	9 - 60	12 - 85	15 - 107	18 - 81
Standaardafwijking	16	23	29	20
	♂ niet geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	55	39	46	65
Spreidingsbreedte	20 - 77	10 - 89	12 - 98	21 - 91
Standaardafwijking	18	25	27	22
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	67	44	53	60
Spreidingsbreedte	17 - 100	25 - 73	18 - 85	21 - 97
Standaardafwijking	26	15	21	24
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	50	38	62	56
Spreidingsbreedte	19 - 76	9 - 101	15 - 101	20 - 103
Standaardafwijking	18	29	27	26

Tabel A20 - Vrij β -alanine-gehalte in *S. acanthias* (mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	14	16	19	14
Spreidingsbreedte	4 - 24	7 - 24	5 - 27	6 - 27
Standaardafwijking	6,3	5,3	6,9	6,6
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	15	13	20	17
Spreidingsbreedte	3 - 25	2 - 22	11 - 28	7 - 30
Standaardafwijking	6,9	6,3	5,3	7,2
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	13	17	13	18
Spreidingsbreedte	4 - 22	7 - 28	3 - 25	9 - 28
Standaardafwijking	5,7	6,6	6,9	5,9
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	16	14	17	20
Spreidingsbreedte	8 - 26	5 - 25	9 - 30	10 - 29
Standaardafwijking	5,6	6,3	6,6	6,0

Tabel A21 - Vrij cysteïne-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
Gemiddelde	<u>1967</u> 10,4	<u>1967</u> 9,0	<u>1968</u> 7,5	<u>1968</u> 6,8
Spreidingsbreedte	4,7 - 15,2	5,2 - 13,5	2,6 - 16,6	3,0 - 14,1
Standaardafwijking	3,3	2,6	4,4	3,5
	0 niet geslachtsrijp +			
Gemiddelde	<u>1967</u> 7,9	<u>1967</u> 8,3	<u>1968</u> 8,8	<u>1968</u> 10,3
Spreidingsbreedte	3,8 - 13,0	3,0 - 15,7	3,8 - 16,2	2,6 - 15,9
Standaardafwijking	2,9	4,0	3,9	4,2
	♂ geslachtsrijp			
Gemiddelde	<u>1967</u> 8,5	<u>1967</u> 7,2	<u>1968</u> 6,5	<u>1968</u> 9,2
Spreidingsbreedte	3,5 - 12,4	2,1 - 14,8	3,0 - 14,1	2,6 - 16,3
Standaardafwijking	2,8	4,0	3,5	4,3
	♂ niet geslachtsrijp			
Gemiddelde	<u>1967</u> 9,3	<u>1967</u> 8,0	<u>1968</u> 5,9	<u>1968</u> 7,5
Spreidingsbreedte	3,8 - 15,9	4,2 - 12,8	3,0 - 15,7	2,9 - 12,7
Standaardafwijking	3,8	2,7	4,0	3,1

Tabel A22 - Vrij cystine-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	11,4	9,0	7,3	9,8
Spreidingsbreedte	4,0 - 15,1	2,4 - 15,7	3,1 - 14,5	5,2 - 14,4
Standaardafwijking	3,5	4,2	3,6	2,9
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	8,3	12,0	8,2	7,9
Spreidingsbreedte	1,9 - 14,0	7,0 - 15,2	2,1 - 14,5	1,8 - 14,5
Standaardafwijking	3,8	2,6	3,9	4,0
	♂ [↑] geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	9,5	8,0	10,5	11,0
Spreidingsbreedte	3,2 - 16,5	3,6 - 14,1	2,9 - 14,0	7,6 - 15,2
Standaardafwijking	4,2	3,3	3,8	2,4
	♂ [↑] niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	7,1	9,2	10,4	11,3
Spreidingsbreedte	2,0 - 13,7	3,2 - 15,9	4,1 - 15,8	4,5 - 16,9
Standaardafwijking	3,7	4,0	3,7	3,9

Tabel A23 - Vrij proline-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	96	105	84	112
Spreidingsbreedte	43 - 130	38 - 131	40 - 136	40 - 133
Standaardafwijking	27	29	23	29
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	105	86	111	93
Spreidingsbreedte	39 - 129	40 - 118	43 - 126	37 - 125
Standaardafwijking	28	24	26	27
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	85	102	111	93
Spreidingsbreedte	43 - 119	55 - 123	50 - 133	42 - 112
Standaardafwijking	23	21	26	22
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	102	88	115	98
Spreidingsbreedte	56 - 138	63 - 127	60 - 133	57 - 123
Standaardafwijking	25	20	23	20

Tabel A24 - Vrij hydroxyproline-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	10,6	8,9	12,3	9,2
Spreidingsbreedte	4,2 - 16,3	3,8 - 14,0	6,0 - 15,2	4,1 - 16,5
Standaardafwijking	3,8	3,2	2,9	3,9
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	10,6	11,5	12,0	9,1
Spreidingsbreedte	4,0 - 15,4	5,7 - 15,5	5,5 - 17,9	4,7 - 14,2
Standaardafwijking	3,6	3,1	3,9	3,0
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	8,5	12,0	10,3	11,1
Spreidingsbreedte	4,1 - 15,2	5,2 - 15,0	4,1 - 14,6	3,5 - 16,8
Standaardafwijking	3,5	3,1	3,3	4,2
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	11,5	13,1	8,7	9,5
Spreidingsbreedte	5,5 - 19,2	4,1 - 15,2	4,2 - 13,7	5,0 - 16,7
Standaardafwijking	4,3	3,5	3,0	3,7

Tabel A25 - Vrij choline-gehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	4,4	6,2	3,5	4,8
Spreidingsbreedte	1,5 - 10,5	2,0 - 10,9	1,0 - 9,2	2,0 - 11,0
Standaardafwijking	3,1	2,7	2,6	2,8
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	6,0	4,1	2,9	5,2
Spreidingsbreedte	1,5 - 10,1	2,0 - 10,8	0,8 - 10,7	1,6 - 9,8
Standaardafwijking	2,7	2,7	3,1	2,6
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	2,6	4,3	3,2	5,5
Spreidingsbreedte	1,0 - 10,1	1,2 - 10,4	0,7 - 9,1	1,1 - 10,1
Standaardafwijking	2,8	2,9	2,6	2,8
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	4,7	3,8	5,6	3,0
Spreidingsbreedte	1,0 - 10,1	1,1 - 8,8	1,9 - 10,5	0,9 - 10,8
Standaardafwijking	2,8	2,4	2,7	3,1

Tabel A26 - Betaïnegehalte in *S. acanthias* (in mg %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	102	63	82	124
Spreidingsbreedte	38 - 244	44 - 196	51 - 229	35 - 273
Standaardafwijking	65	48	56	75
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	75	110	142	91
Spreidingsbreedte	45 - 235	33 - 262	50 - 212	42 - 182
Standaardafwijking	60	72	51	44
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	109	59	81	145
Spreidingsbreedte	55 - 277	29 - 230	34 - 193	53 - 282
Standaardafwijking	70	63	50	72
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	88	133	95	71
Spreidingsbreedte	41 - 225	30 - 265	49 - 224	32 - 213
Standaardafwijking	58	74	55	57

Tabel A27 - Droge stofgehalte in *S. acanthias* (in %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	22,9	21,5	22,8	24,5
Spreidingsbreedte	20,5 - 25,6	20,5 - 24,9	21,3 - 26,1	22,3 - 26,9
Standaardafwijking	1,6	1,3	1,5	1,4
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	24,0	25,4	22,9	24,9
Spreidingsbreedte	22,8 - 27,6	21,9 - 27,2	21,0 - 25,4	22,3 - 27,1
Standaardafwijking	1,5	1,6	1,3	1,5
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	25,2	23,0	25,4	23,6
Spreidingsbreedte	23,0 - 27,7	20,5 - 24,9	22,6 - 27,1	21,9 - 26,4
Standaardafwijking	1,4	1,4	1,4	1,4
Algemeen gemiddelde	24,0	23,3	23,7	24,3
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	21,9	24,6	23,8	25,2
Spreidingsbreedte	20,9 - 26,1	21,5 - 26,8	21,0 - 25,4	22,1 - 26,8
Standaardafwijking	1,6	1,6	1,3	1,5
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	26,5	22,2	24,7	22,0
Spreidingsbreedte	22,2 - 27,1	21,0 - 25,3	22,6 - 27,7	20,8 - 25,9
Standaardafwijking	1,5	1,3	1,6	1,6
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	24,3	25,1	25,2	23,9
Spreidingsbreedte	21,9 - 26,2	23,0 - 28,0	22,0 - 27,4	20,6 - 25,8
Standaardafwijking	1,3	1,5	1,7	1,6
Algemeen gemiddelde	24,2	23,9	24,5	23,7

Tabel A27 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	26,1	23,5	24,5	22,0
Spreidingsbreedte	24,0 - 28,5	20,5 - 25,8	21,8 - 26,6	20,1 - 24,6
Standaardafwijking	1,4	1,6	1,5	1,4
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	21,7	24,2	25,6	26,0
Spreidingsbreedte	20,1 - 24,2	22,0 - 26,7	22,4 - 28,5	23,2 - 28,4
Standaardafwijking	1,2	1,4	1,9	1,6
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	22,9	23,8	21,9	25,5
Spreidingsbreedte	20,7 - 24,9	21,2 - 26,0	20,2 - 24,6	22,4 - 27,5
Standaardafwijking	1,3	1,5	1,3	1,6
Algemeen gemiddelde	23,5	23,8	24,0	24,5
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	24,0	24,1	23,9	26,0
Spreidingsbreedte	22,1 - 26,8	21,6 - 26,8	21,8 - 26,2	23,3 - 28,3
Standaardafwijking	1,4	1,6	1,3	1,5
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	22,9	22,5	25,1	23,6
Spreidingsbreedte	20,9 - 25,1	20,7 - 25,1	23,1 - 27,9	21,1 - 26,4
Standaardafwijking	1,3	1,3	1,5	1,6
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	26,2	25,3	23,8	23,1
Spreidingsbreedte	22,2 - 27,3	23,1 - 28,2	21,2 - 25,8	21,0 - 25,7
Standaardafwijking	1,6	1,6	1,4	1,4
Algemeen gemiddelde	24,3	23,9	24,2	24,2

Tabel A28 - Totaal stikstofgehalte in *S. acanthias* (in %).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	0 geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	3,41	3,52	3,38	3,42
Spreidingsbreedte	3,22 - 3,72	3,23 - 3,78	3,15 - 3,58	3,25 - 3,73
Standaardafwijking	0,15	0,17	0,13	0,15
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	3,46	3,37	3,53	3,36
Spreidingsbreedte	3,24 - 3,75	3,17 - 3,58	3,15 - 3,72	3,20 - 3,69
Standaardafwijking	0,16	0,12	0,17	0,15
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	3,35	3,40	3,35	3,46
Spreidingsbreedte	3,17 - 3,62	3,15 - 3,65	3,16 - 3,67	3,31 - 3,80
Standaardafwijking	0,14	0,15	0,16	0,15
Algemeen gemiddelde	3,40	3,43	3,42	3,42
	0 niet geslachtsrijp +			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	3,38	3,40	3,55	3,38
Spreidingsbreedte	3,11 - 3,59	3,25 - 3,74	3,34 - 3,86	3,19 - 3,64
Standaardafwijking	0,15	0,15	0,16	0,14
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	3,39	3,31	3,30	3,45
Spreidingsbreedte	3,19 - 3,68	3,10 - 3,65	3,13 - 3,66	3,20 - 3,68
Standaardafwijking	0,15	0,17	0,16	0,15
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	3,50	3,42	3,43	3,36
Spreidingsbreedte	3,22 - 3,73	3,23 - 3,70	3,21 - 3,62	3,17 - 3,72
Standaardafwijking	0,16	0,14	0,12	0,17
Algemeen gemiddelde	3,42	3,37	3,42	3,39

Tabel A28 - Vervolg.

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	3,50	3,31	3,37	3,51
Spreidingsbreedte	3,25 - 3,77	3,11 - 3,56	3,10 - 3,57	3,25 - 3,85
Standaardafwijking	0,16	0,14	0,14	0,18
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	3,32	3,52	3,54	3,33
Spreidingsbreedte	3,11 - 3,63	3,24 - 3,82	3,24 - 3,75	3,14 - 3,60
Standaardafwijking	0,16	0,18	0,16	0,14
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	3,42	3,39	3,40	3,42
Spreidingsbreedte	3,23 - 3,74	3,19 - 3,63	3,11 - 3,63	3,19 - 3,72
Standaardafwijking	0,16	0,13	0,16	0,16
Algemeen gemiddelde	3,41	3,40	3,43	3,42
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1965</u>	<u>1965</u>	<u>1966</u>	<u>1966</u>
Gemiddelde	3,39	3,38	3,49	3,37
Spreidingsbreedte	3,19 - 3,75	3,12 - 3,63	3,24 - 3,75	3,15 - 3,62
Standaardafwijking	0,17	0,16	0,16	0,14
	<u>1966</u>	<u>1966</u>	<u>1967</u>	<u>1967</u>
Gemiddelde	3,32	3,35	3,31	3,54
Spreidingsbreedte	3,13 - 3,58	3,11 - 3,56	3,09 - 3,61	3,30 - 3,76
Standaardafwijking	0,14	0,14	0,16	0,14
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	3,43	3,44	3,40	3,38
Spreidingsbreedte	3,10 - 3,66	3,24 - 3,76	3,20 - 3,70	3,16 - 3,62
Standaardafwijking	0,17	0,16	0,15	0,14
Algemeen gemiddelde	3,38	3,39	3,40	3,43

Tabel A29 - Kathepsinen-aktiviteit in *S. acanthias* (in $\mu\text{g tyr.}/\text{h/g}$).

	Zomer	Herfst	Winter	Lente
	♀ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	204	220	185	211
Spreidingsbreedte	131 - 296	140 - 378	102 - 299	111 - 298
Standaardafwijking	52	75	62	59
	♀ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	270	235	220	281
Spreidingsbreedte	141 - 344	128 - 287	113 - 323	135 - 357
Standaardafwijking	64	50	66	70
	♂ geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	220	215	190	206
Spreidingsbreedte	101 - 295	115 - 302	95 - 260	120 - 336
Standaardafwijking	61	59	52	68
	♂ niet geslachtsrijp			
	<u>1967</u>	<u>1967</u>	<u>1968</u>	<u>1968</u>
Gemiddelde	248	266	254	232
Spreidingsbreedte	125 - 354	130 - 346	111 - 270	141 - 293
Standaardafwijking	72	68	50	48

(in mg N %).

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
♀ geslachtsrijp																				
1	25	24	32	48	100	16	25	29	55	126	19	27	31	53	99	-	-	-	-	-
2	18	19	23	31	81	24	27	31	50	119	27	25	29	36	83	15	15	19	46	101
3	14	18	20	35	78	12	17	24	42	108	20	26	27	52	120	24	26	26	41	94
Gem.	<u>19</u>	<u>20</u>	<u>25</u>	<u>38</u>	<u>86</u>	<u>17</u>	<u>23</u>	<u>28</u>	<u>52</u>	<u>118</u>	<u>22</u>	<u>26</u>	<u>29</u>	<u>47</u>	<u>101</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>23</u>	<u>44</u>	<u>97</u>
♀ niet geslachtsrijp																				
1	12	17	22	73	160	17	33	44	75	170	20	23	40	75	141	25	36	46	61	149
2	21	25	41	63	146	24	24	35	58	142	11	26	35	69	123	24	31	44	73	121
3	21	28	32	50	115	25	26	32	64	131	17	27	46	65	110	14	28	38	62	133
Gem.	<u>13</u>	<u>23</u>	<u>31</u>	<u>62</u>	<u>140</u>	<u>22</u>	<u>27</u>	<u>37</u>	<u>66</u>	<u>148</u>	<u>16</u>	<u>25</u>	<u>40</u>	<u>70</u>	<u>124</u>	<u>21</u>	<u>32</u>	<u>43</u>	<u>65</u>	<u>134</u>
♂ geslachtsrijp																				
1	23	22	29	40	117	27	27	32	58	102	17	20	26	47	99	20	26	30	57	106
2	20	20	31	51	91	24	29	30	46	90	20	23	25	30	77	15	18	28	41	120
3	26	26	30	27	75	23	25	33	58	123	13	20	22	32	86	22	25	24	38	118
Gem.	<u>23</u>	<u>25</u>	<u>30</u>	<u>39</u>	<u>94</u>	<u>25</u>	<u>27</u>	<u>32</u>	<u>54</u>	<u>105</u>	<u>17</u>	<u>21</u>	<u>24</u>	<u>36</u>	<u>88</u>	<u>19</u>	<u>23</u>	<u>27</u>	<u>45</u>	<u>115</u>
♂ niet geslachtsrijp																				
1	13	25	41	60	112	-	-	-	-	-	27	31	45	71	163	26	29	35	75	132
2	24	36	47	73	139	15	26	35	59	158	21	27	30	53	108	16	28	36	55	120
3	24	34	36	69	115	22	31	42	68	132	21	22	26	59	145	21	33	38	76	148
Gem.	<u>20</u>	<u>31</u>	<u>41</u>	<u>67</u>	<u>122</u>	<u>18</u>	<u>28</u>	<u>38</u>	<u>64</u>	<u>145</u>	<u>23</u>	<u>26</u>	<u>33</u>	<u>61</u>	<u>139</u>	<u>21</u>	<u>30</u>	<u>36</u>	<u>69</u>	<u>133</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	1924	1820	1073	402	809	1914	1777	1096	807	676	1965	1801	990	881	702	-	-	-	-	-
2	1863	1635	952	674	559	1880	1758	1302	1110	1077	1825	1623	1209	980	737	1989	1746	1299	1109	1033
3	1854	1617	899	679	532	1917	1720	905	798	650	1900	1692	1172	1002	900	1858	1694	1192	938	932
Gem.	<u>1880</u>	<u>1690</u>	<u>976</u>	<u>752</u>	<u>633</u>	<u>1903</u>	<u>1752</u>	<u>1101</u>	<u>905</u>	<u>801</u>	<u>1897</u>	<u>1705</u>	<u>1123</u>	<u>954</u>	<u>780</u>	<u>1924</u>	<u>1720</u>	<u>1245</u>	<u>1023</u>	<u>982</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	2015	1660	1201	908	700	1890	1555	990	905	811	1977	1808	1352	1211	1150	1878	1515	1100	976	901
2	1959	1381	953	674	584	1844	1348	747	745	738	1922	1520	1003	970	925	1909	1660	1222	942	817
3	1970	1452	863	708	552	1803	1209	861	776	709	1906	1474	1015	984	808	1920	1385	737	730	684
Gem.	<u>1981</u>	<u>1498</u>	<u>1005</u>	<u>763</u>	<u>612</u>	<u>1845</u>	<u>1370</u>	<u>866</u>	<u>809</u>	<u>753</u>	<u>1935</u>	<u>1601</u>	<u>1123</u>	<u>1055</u>	<u>961</u>	<u>1902</u>	<u>1520</u>	<u>1020</u>	<u>883</u>	<u>801</u>
0 ↗ geslachtsrijp																				
1	1877	1700	1100	905	745	2007	1866	1311	1099	851	1910	1791	1202	1100	922	1919	1685	1154	1009	909
2	1833	1651	857	754	606	1943	1732	1309	756	692	1894	1630	959	971	810	1870	1714	1223	885	754
3	1845	1649	1036	947	630	1970	1809	1094	880	707	1868	1742	1129	869	701	1901	1645	1072	808	733
Gem.	<u>1852</u>	<u>1666</u>	<u>998</u>	<u>869</u>	<u>660</u>	<u>1973</u>	<u>1802</u>	<u>1238</u>	<u>911</u>	<u>750</u>	<u>1890</u>	<u>1721</u>	<u>1096</u>	<u>980</u>	<u>811</u>	<u>1897</u>	<u>1681</u>	<u>1150</u>	<u>901</u>	<u>798</u>
0 ↗ niet geslachtsrijp																				
1	1951	1601	1187	1104	930	-	-	-	-	-	1901	1359	951	750	731	1931	1539	1105	994	930
2	1976	1351	850	743	652	1918	1610	953	894	709	1880	1382	903	663	645	1878	1197	824	799	702
3	1925	1304	1006	886	349	1925	1489	768	687	598	1858	1700	1199	1001	966	1914	1423	949	918	810
Gem.	<u>1950</u>	<u>1418</u>	<u>981</u>	<u>911</u>	<u>810</u>	<u>1922</u>	<u>1550</u>	<u>860</u>	<u>791</u>	<u>654</u>	<u>1879</u>	<u>1480</u>	<u>1017</u>	<u>804</u>	<u>781</u>	<u>1908</u>	<u>1386</u>	<u>959</u>	<u>904</u>	<u>814</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	0	0,7	3,0	4,6	13,8	0,6	1,5	2,0	2,5	19,0	0	0	3,1	5,6	18,5	-	-	-	-	-
2	0	0,5	1,5	3,8	16,0	0	0,7	2,2	7,0	10,8	0,6	0,6	1,2	2,5	13,3	0,5	0,4	3,5	6,0	15,1
3	0,3	0,6	2,1	5,0	15,5	0,2	0,9	3,0	4,3	11,6	0	0,6	1,7	7,1	16,0	0,2	0,8	0,9	5,1	10,5
Gem.	<u>0,1</u>	<u>0,6</u>	<u>2,2</u>	<u>4,4</u>	<u>15,1</u>	<u>0,2</u>	<u>1,0</u>	<u>2,4</u>	<u>4,6</u>	<u>13,8</u>	<u>0,2</u>	<u>0,4</u>	<u>2,0</u>	<u>5,0</u>	<u>15,9</u>	<u>0,2</u>	<u>0,6</u>	<u>2,2</u>	<u>5,5</u>	<u>12,8</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	0	1,1	3,6	6,4	15,0	0	0,5	4,5	6,2	18,0	1,0	2,4	5,5	9,4	12,4	0	2,3	2,1	2,5	2,6
2	0	0,6	4,6	7,5	15,5	1,2	1,0	5,6	6,5	11,7	0	2,5	3,6	6,1	16,5	0	1,7	5,1	8,2	14,4
3	0	0,7	2,1	5,0	13,1	0	0,2	3,4	4,9	12,2	0,3	3,9	2,9	6,3	8,8	0,6	2,2	3,0	6,8	15,9
Gem.	<u>0</u>	<u>2,2</u>	<u>3,4</u>	<u>6,3</u>	<u>14,5</u>	<u>0,4</u>	<u>2,0</u>	<u>4,5</u>	<u>6,8</u>	<u>13,9</u>	<u>0,4</u>	<u>2,6</u>	<u>4,0</u>	<u>7,2</u>	<u>12,5</u>	<u>0,2</u>	<u>1,7</u>	<u>3,4</u>	<u>6,8</u>	<u>10,9</u>
0 geslachtsrijp ↗																				
1	0	0,6	2,0	3,4	15,0	0	0,5	1,9	4,2	19,4	1,0	1,0	4,2	5,5	12,0	0	0,5	0,5	0,6	2,5
2	0,5	0,3	4,2	6,0	10,5	1,2	0,8	2,0	2,0	13,0	0	1,4	2,8	7,0	16,5	0,2	1,5	3,2	4,8	15,6
3	0	1,0	0,9	1,8	17,8	0,2	0,6	4,0	4,5	16,2	0,2	0	2,0	2,4	11,9	0	1,2	2,3	4,5	16,7
Gem.	<u>0,2</u>	<u>0,5</u>	<u>2,7</u>	<u>3,7</u>	<u>14,4</u>	<u>0,3</u>	<u>0,6</u>	<u>2,3</u>	<u>3,5</u>	<u>16,2</u>	<u>0,4</u>	<u>0,8</u>	<u>3,0</u>	<u>4,9</u>	<u>13,4</u>	<u>0,1</u>	<u>1,0</u>	<u>2,0</u>	<u>3,3</u>	<u>11,6</u>
0 niet geslachtsrijp ↗																				
1	0	1,7	4,2	5,9	11,5	-	-	-	-	-	0,3	1,2	4,2	8,1	13,1	0	1,9	4,6	7,5	15,5
2	0	2,1	5,3	8,2	25,4	0,5	2,6	5,1	8,0	18,5	0,5	2,7	2,7	5,6	15,0	0,7	1,9	6,1	8,6	18,2
3	0,8	1,8	4,9	5,0	13,0	0	1,5	3,0	6,7	12,7	0	2,6	3,6	4,4	10,2	0	2,6	4,3	4,8	10,3
Gem.	<u>0,2</u>	<u>1,8</u>	<u>4,8</u>	<u>6,3</u>	<u>16,6</u>	<u>0,2</u>	<u>2,0</u>	<u>4,1</u>	<u>7,3</u>	<u>15,6</u>	<u>0,2</u>	<u>2,2</u>	<u>3,7</u>	<u>6,0</u>	<u>12,7</u>	<u>0,2</u>	<u>2,1</u>	<u>4,6</u>	<u>6,9</u>	<u>14,6</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	212	200	149	141	100	190	170	149	137	90	220	200	162	118	103	-	-	-	-	-
2	185	168	133	119	111	215	191	161	150	120	205	194	140	130	112	204	200	168	102	89
3	178	163	123	115	83	206	187	170	124	69	173	154	127	103	91	191	168	135	143	110
Gem.	<u>191</u>	<u>177</u>	<u>135</u>	<u>125</u>	<u>98</u>	<u>203</u>	<u>182</u>	<u>160</u>	<u>137</u>	<u>93</u>	<u>199</u>	<u>182</u>	<u>143</u>	<u>117</u>	<u>102</u>	<u>198</u>	<u>184</u>	<u>151</u>	<u>123</u>	<u>100</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	177	148	135	123	111	217	195	149	109	101	194	144	128	92	79	192	176	144	121	114
2	203	182	152	112	90	210	183	124	120	101	195	181	143	117	100	175	148	127	100	95
3	189	150	118	107	87	181	141	105	107	95	207	173	125	106	91	219	180	137	103	76
Gem.	<u>189</u>	<u>160</u>	<u>135</u>	<u>114</u>	<u>96</u>	<u>202</u>	<u>173</u>	<u>126</u>	<u>112</u>	<u>99</u>	<u>198</u>	<u>166</u>	<u>132</u>	<u>105</u>	<u>90</u>	<u>195</u>	<u>168</u>	<u>136</u>	<u>108</u>	<u>95</u>
♂ geslachtsrijp																				
1	195	170	155	130	102	189	174	145	135	121	220	209	165	140	97	201	196	120	128	123
2	205	190	130	118	95	192	171	135	125	102	181	165	140	127	110	205	189	161	117	85
3	198	178	135	126	103	211	189	128	129	89	203	190	169	138	84	179	168	154	115	110
Gem.	<u>199</u>	<u>179</u>	<u>140</u>	<u>124</u>	<u>100</u>	<u>197</u>	<u>178</u>	<u>136</u>	<u>129</u>	<u>104</u>	<u>201</u>	<u>188</u>	<u>158</u>	<u>135</u>	<u>97</u>	<u>195</u>	<u>184</u>	<u>145</u>	<u>120</u>	<u>107</u>
♂ niet geslachtsrijp																				
1	185	164	142	119	100	-	-	-	-	-	209	153	133	109	102	204	161	140	126	116
2	177	164	119	101	78	190	157	123	100	83	218	182	150	118	108	220	190	135	105	83
3	206	185	129	101	95	205	169	150	129	104	175	169	119	106	90	191	144	112	96	77
Gem.	<u>189</u>	<u>171</u>	<u>130</u>	<u>107</u>	<u>91</u>	<u>198</u>	<u>163</u>	<u>137</u>	<u>115</u>	<u>94</u>	<u>200</u>	<u>168</u>	<u>134</u>	<u>111</u>	<u>100</u>	<u>205</u>	<u>165</u>	<u>129</u>	<u>109</u>	<u>92</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	456	403	353	320	327	551	388	440	419	306	494	458	435	411	241	-	-	-	-	-
2	502	459	419	401	261	467	450	369	333	333	569	483	453	425	191	442	338	326	303	288
3	469	398	331	320	238	490	372	396	387	239	501	411	382	369	292	533	459	395	367	371
Gem.	<u>475</u>	<u>420</u>	<u>363</u>	<u>350</u>	<u>275</u>	<u>503</u>	<u>403</u>	<u>402</u>	<u>380</u>	<u>293</u>	<u>521</u>	<u>451</u>	<u>423</u>	<u>402</u>	<u>241</u>	<u>488</u>	<u>398</u>	<u>360</u>	<u>335</u>	<u>330</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	544	461	440	407	236	440	323	-	282	252	452	391	365	328	235	523	367	358	318	276
2	502	405	383	361	154	511	387	355	331	345	539	429	398	375	316	491	420	417	381	222
3	499	393	381	336	144	448	295	270	241	266	487	361	322	300	181	560	361	334	293	200
Gem.	<u>515</u>	<u>420</u>	<u>401</u>	<u>368</u>	<u>174</u>	<u>466</u>	<u>335</u>	<u>313</u>	<u>285</u>	<u>288</u>	<u>493</u>	<u>394</u>	<u>361</u>	<u>334</u>	<u>244</u>	<u>525</u>	<u>382</u>	<u>369</u>	<u>330</u>	<u>232</u>
0 ↗ geslachtsrijp																				
1	472	-	414	390	274	539	400	379	333	221	485	452	447	423	286	522	412	385	359	324
2	510	479	452	435	318	547	461	419	382	300	530	373	373	372	358	460	473	457	440	361
3	451	406	390	363	224	483	358	335	301	192	472	428	381	331	276	463	390	381	352	286
Gem.	<u>477</u>	<u>443</u>	<u>418</u>	<u>398</u>	<u>272</u>	<u>523</u>	<u>406</u>	<u>377</u>	<u>339</u>	<u>238</u>	<u>496</u>	<u>418</u>	<u>401</u>	<u>375</u>	<u>306</u>	<u>481</u>	<u>425</u>	<u>407</u>	<u>384</u>	<u>323</u>
0 ↗ niet geslachtsrijp																				
1	509	440	407	364	222	-	-	-	-	-	498	351	350	340	259	513	448	420	384	281
2	531	382	353	320	277	565	426	385	330	313	445	414	379	376	154	475	358	338	290	202
3	488	395	359	299	181	514	323	302	264	200	448	338	308	291	216	-	369	363	333	231
Gem.	<u>509</u>	<u>406</u>	<u>373</u>	<u>328</u>	<u>227</u>	<u>540</u>	<u>375</u>	<u>343</u>	<u>297</u>	<u>256</u>	<u>463</u>	<u>368</u>	<u>346</u>	<u>336</u>	<u>209</u>	<u>494</u>	<u>391</u>	<u>374</u>	<u>301</u>	<u>238</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
♀ geslachtsrijp																				
1	68	60	76	72	63	54	50	61	55	46	48	41	45	41	26	-	-	-	-	-
2	44	38	55	51	40	32	21	30	28	18	70	62	67	60	11	48	42	50	46	14
3	73	56	62	56	25	59	41	47	39	28	46	34	39	35	42	65	64	67	57	25
Gem.	<u>62</u>	<u>51</u>	<u>64</u>	<u>60</u>	<u>43</u>	<u>48</u>	<u>37</u>	<u>46</u>	<u>40</u>	<u>31</u>	<u>55</u>	<u>46</u>	<u>50</u>	<u>45</u>	<u>26</u>	<u>57</u>	<u>53</u>	<u>58</u>	<u>51</u>	<u>19</u>
♀ niet geslachtsrijp																				
1	77	68	73	70	58	68	60	-	41	19	71	57	66	60	39	31	39	38	28	10
2	50	35	59	54	24	46	62	73	61	50	38	26	39	33	13	37	35	41	42	19
3	71	66	48	50	37	44	33	54	43	29	43	31	47	41	35	65	62	70	55	45
Gem.	<u>66</u>	<u>56</u>	<u>60</u>	<u>58</u>	<u>40</u>	<u>53</u>	<u>52</u>	<u>63</u>	<u>48</u>	<u>32</u>	<u>50</u>	<u>38</u>	<u>51</u>	<u>45</u>	<u>29</u>	<u>44</u>	<u>45</u>	<u>49</u>	<u>42</u>	<u>24</u>
♂ geslachtsrijp																				
1	61	39	65	56	46	47	-	62	59	48	68	52	55	47	10	23	19	41	44	38
2	35	64	42	37	28	72	53	69	63	57	46	46	67	60	30	63	50	60	55	55
3	40	37	51	50	21	51	28	40	32	26	75	66	72	66	15	39	44	35	23	20
Gem.	<u>45</u>	<u>46</u>	<u>53</u>	<u>48</u>	<u>31</u>	<u>57</u>	<u>40</u>	<u>57</u>	<u>51</u>	<u>44</u>	<u>63</u>	<u>55</u>	<u>64</u>	<u>57</u>	<u>18</u>	<u>41</u>	<u>38</u>	<u>45</u>	<u>41</u>	<u>38</u>
♂ niet geslachtsrijp																				
1	66	54	58	37	22	-	-	-	-	-	69	61	63	55	19	56	53	60	55	51
2	33	25	50	51	30	72	63	68	52	36	38	48	65	60	27	31	20	37	30	16
3	47	61	68	61	52	51	34	45	41	17	46	42	51	34	10	-	32	43	43	23
Gem.	<u>49</u>	<u>47</u>	<u>59</u>	<u>50</u>	<u>35</u>	<u>61</u>	<u>48</u>	<u>56</u>	<u>47</u>	<u>26</u>	<u>51</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>49</u>	<u>18</u>	<u>43</u>	<u>35</u>	<u>47</u>	<u>43</u>	<u>30</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	70	61	50	95	66	72	67	60	65	63	59	47	39	98	61	-	-	-	-	-
2	56	45	41	76	42	67	58	49	83	75	64	45	40	82	80	54	50	43	80	41
3	68	55	31	68	31	68	51	44	67	44	65	60	49	101	63	63	59	32	57	26
Gem.	<u>65</u>	<u>53</u>	<u>40</u>	<u>80</u>	<u>46</u>	<u>69</u>	<u>59</u>	<u>51</u>	<u>71</u>	<u>60</u>	<u>62</u>	<u>50</u>	<u>43</u>	<u>94</u>	<u>68</u>	<u>58</u>	<u>55</u>	<u>37</u>	<u>68</u>	<u>33</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	90	57	35	131	123	72	54	24	100	63	89	57	47	120	95	80	68	35	108	91
2	75	43	15	113	77	86	62	43	77	33	77	48	33	79	51	92	65	38	128	110
3	79	49	27	88	61	66	46	20	80	38	85	62	51	91	75	89	49	20	104	-
Gem.	<u>81</u>	<u>50</u>	<u>25</u>	<u>110</u>	<u>87</u>	<u>75</u>	<u>54</u>	<u>32</u>	<u>86</u>	<u>45</u>	<u>84</u>	<u>55</u>	<u>44</u>	<u>97</u>	<u>73</u>	<u>87</u>	<u>60</u>	<u>31</u>	<u>118</u>	<u>101</u>
0 geslachtsrijp ↗																				
1	68	64	57	91	72	66	60	53	84	44	63	56	46	81	79	54	50	45	88	43
2	51	53	39	90	43	70	55	45	70	30	49	41	30	66	50	68	61	56	102	63
3	63	54	42	70	37	55	49	51	72	42	53	43	40	62	62	60	46	41	83	38
Gem.	<u>60</u>	<u>57</u>	<u>46</u>	<u>84</u>	<u>50</u>	<u>64</u>	<u>54</u>	<u>50</u>	<u>75</u>	<u>39</u>	<u>55</u>	<u>46</u>	<u>39</u>	<u>70</u>	<u>63</u>	<u>61</u>	<u>52</u>	<u>47</u>	<u>91</u>	<u>48</u>
0 niet geslachtsrijp ↗																				
1	81	70	15	112	95	-	-	-	-	-	79	56	30	80	38	72	60	19	111	80
2	94	67	29	138	-	71	57	46	98	87	91	64	46	98	42	69	53	33	78	45
3	84	45	38	94	62	82	40	33	69	52	72	50	28	119	66	82	44	35	83	64
Gem.	<u>86</u>	<u>61</u>	<u>27</u>	<u>115</u>	<u>78</u>	<u>77</u>	<u>49</u>	<u>40</u>	<u>83</u>	<u>69</u>	<u>80</u>	<u>56</u>	<u>35</u>	<u>99</u>	<u>48</u>	<u>74</u>	<u>52</u>	<u>29</u>	<u>90</u>	<u>63</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	75	73	70	56	18	60	-	55	36	6	57	52	47	31	19	-	-	-	-	-
2	73	60	61	32	31	69	72	61	20	0	45	43	36	19	19	60	56	52	20	11
3	61	55	50	37	12	62	49	42	21	10	39	31	24	12	3	45	43	41	33	28
Gem.	<u>70</u>	<u>53</u>	<u>60</u>	<u>41</u>	<u>20</u>	<u>64</u>	<u>60</u>	<u>53</u>	<u>25</u>	<u>5</u>	<u>47</u>	<u>42</u>	<u>36</u>	<u>20</u>	<u>14</u>	<u>53</u>	<u>50</u>	<u>47</u>	<u>26</u>	<u>20</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	59	55	50	38	35	59	62	60	45	15	60	61	58	43	35	51	48	45	25	14
2	70	39	33	31	30	71	50	52	31	26	64	-	52	32	26	40	39	30	10	0
3	56	49	43	21	18	73	52	55	34	12	46	48	46	20	13	45	41	39	11	6
Gem.	<u>61</u>	<u>47</u>	<u>42</u>	<u>30</u>	<u>28</u>	<u>68</u>	<u>54</u>	<u>56</u>	<u>36</u>	<u>18</u>	<u>56</u>	<u>55</u>	<u>52</u>	<u>31</u>	<u>25</u>	<u>45</u>	<u>43</u>	<u>38</u>	<u>15</u>	<u>7</u>
0 ↗ geslachtsrijp																				
1	69	61	60	30	9	72	70	62	40	33	48	49	44	17	11	49	41	32	16	13
2	57	43	37	15	2	75	63	49	39	36	61	55	50	29	20	61	61	55	37	31
3	53	45	45	21	12	68	52	46	27	21	40	32	28	10	5	66	60	62	43	24
Gem.	<u>63</u>	<u>50</u>	<u>47</u>	<u>22</u>	<u>8</u>	<u>72</u>	<u>61</u>	<u>52</u>	<u>35</u>	<u>30</u>	<u>50</u>	<u>45</u>	<u>41</u>	<u>18</u>	<u>12</u>	<u>58</u>	<u>54</u>	<u>50</u>	<u>32</u>	<u>23</u>
0 ↗ niet geslachtsrijp																				
1	63	64	66	26	12	-	-	-	-	-	60	52	49	32	26	47	40	37	13	9
2	72	60	54	40	27	67	54	60	21	20	41	37	39	22	11	62	56	51	37	32
3	60	51	50	29	17	54	45	47	35	13	45	41	31	14	-	49	50	46	27	18
Gem.	<u>65</u>	<u>58</u>	<u>57</u>	<u>32</u>	<u>19</u>	<u>60</u>	<u>49</u>	<u>54</u>	<u>28</u>	<u>16</u>	<u>48</u>	<u>43</u>	<u>40</u>	<u>23</u>	<u>18</u>	<u>52</u>	<u>49</u>	<u>45</u>	<u>25</u>	<u>20</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	6,4	8,5	10,2	19,4	45,1	9,8	11,2	16,6	21,5	43,9	8,4	10,8	14,0	30,2	47,7	-	-	-	-	-
2	0	2,6	3,8	10,5	36,2	10,1	9,8	11,9	14,6	39,8	9,5	11,5	10,3	24,9	52,7	3,5	4,1	8,0	8,5	49,7
3	3,1	5,3	4,3	15,6	41,3	2,5	3,2	13,5	25,0	47,0	6,3	7,0	7,4	28,5	48,1	7,8	8,4	14,5	19,4	40,2
Gem.	<u>3,2</u>	<u>5,5</u>	<u>6,2</u>	<u>15,1</u>	<u>40,9</u>	<u>7,5</u>	<u>8,0</u>	<u>14,0</u>	<u>20,4</u>	<u>43,5</u>	<u>8,0</u>	<u>9,8</u>	<u>10,5</u>	<u>27,8</u>	<u>49,5</u>	<u>5,6</u>	<u>6,3</u>	<u>11,2</u>	<u>13,9</u>	<u>45,0</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	0,0	10,4	17,6	31,4	60,1	4,3	6,0	15,4	37,3	55,1	3,8	8,9	19,4	24,7	58,4	11,1	14,4	24,0	35,0	59,1
2	3,3	8,3	12,8	29,2	58,7	4,6	10,8	20,5	36,0	40,3	5,0	5,9	7,3	14,3	66,4	5,9	9,8	17,4	25,6	56,6
3	1,2	3,9	8,8	20,0	47,7	7,6	13,4	15,7	30,1	45,2	9,7	10,3	20,0	28,1	66,5	12,3	13,4	23,9	30,5	45,3
Gem.	<u>4,1</u>	<u>7,5</u>	<u>13,0</u>	<u>26,8</u>	<u>55,5</u>	<u>5,5</u>	<u>10,1</u>	<u>17,2</u>	<u>34,5</u>	<u>46,8</u>	<u>6,2</u>	<u>8,4</u>	<u>15,6</u>	<u>22,4</u>	<u>63,8</u>	<u>9,8</u>	<u>12,5</u>	<u>21,8</u>	<u>30,3</u>	<u>53,7</u>
0 geslachtsrijp ↗																				
1	6,5	10,0	11,9	21,5	48,5	5,6	5,4	6,6	20,2	42,3	2,7	5,4	7,3	20,9	48,5	5,6	6,9	7,2	15,7	49,4
2	8,8	7,2	8,5	12,7	40,3	10,1	9,7	12,0	22,3	46,0	6,8	9,0	10,5	19,4	38,9	7,3	10,1	12,7	25,0	51,0
3	3,5	4,0	10,1	18,8	50,0	8,7	7,5	8,3	14,4	37,4	0	3,5	5,2	10,1	45,4	3,0	7,2	8,6	24,0	44,1
Gem.	<u>5,3</u>	<u>7,0</u>	<u>10,2</u>	<u>17,7</u>	<u>46,3</u>	<u>8,1</u>	<u>7,5</u>	<u>8,9</u>	<u>19,0</u>	<u>41,9</u>	<u>3,2</u>	<u>5,9</u>	<u>7,7</u>	<u>16,8</u>	<u>44,2</u>	<u>5,3</u>	<u>8,0</u>	<u>9,5</u>	<u>21,6</u>	<u>48,2</u>
0 niet geslachtsrijp ↗																				
1	8,5	9,5	19,0	31,5	54,3	-	-	-	-	-	7,6	10,3	10,8	33,2	48,7	4,4	6,1	11,8	29,6	60,5
2	9,7	14,5	22,6	29,4	45,8	6,8	10,1	24,2	30,5	53,2	10,9	14,8	15,2	36,0	59,4	1,5	10,4	20,1	33,1	63,4
3	4,8	9,6	13,7	20,6	40,5	4,1	5,8	16,1	20,6	60,3	9,6	11,4	18,3	30,1	53,8	6,3	11,9	18,5	23,9	56,6
Gem.	<u>7,7</u>	<u>11,2</u>	<u>10,4</u>	<u>27,2</u>	<u>46,9</u>	<u>5,4</u>	<u>7,9</u>	<u>20,1</u>	<u>25,6</u>	<u>56,8</u>	<u>9,4</u>	<u>12,2</u>	<u>14,7</u>	<u>33,1</u>	<u>54,0</u>	<u>4,0</u>	<u>9,5</u>	<u>16,8</u>	<u>28,9</u>	<u>60,1</u>

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
♀ geslachtsrijp +																				
1	6,16	6,32	6,41	6,78	7,79	6,27	6,33	6,49	6,75	8,12	6,30	6,33	6,31	6,68	7,61	-	-	-	-	-
2	6,10	6,22	6,30	6,72	7,96	6,22	6,35	6,40	6,77	8,15	6,35	6,28	6,40	6,86	7,85	6,12	6,15	6,21	6,94	7,71
3	6,08	6,20	6,28	6,60	7,77	6,12	6,26	6,45	6,90	7,90	6,20	6,22	6,24	6,69	7,63	6,21	6,28	6,30	6,85	7,92
Gem.	6,11	6,25	6,33	6,70	7,84	6,20	6,31	6,44	6,84	8,06	6,28	6,27	6,31	6,74	7,70	6,17	6,21	6,25	6,90	7,81
♀ niet geslachtsrijp +																				
1	6,37	6,46	6,77	6,92	8,55	6,16	6,29	6,49	7,19	8,41	6,24	6,32	6,71	7,25	8,13	6,22	6,34	6,55	7,27	8,30
2	6,35	6,48	6,61	7,09	8,28	6,21	6,40	6,62	6,91	8,15	6,09	6,24	6,49	6,99	8,45	6,36	6,45	6,68	7,30	8,11
3	6,29	6,36	6,65	6,83	8,37	6,30	6,33	6,48	7,14	8,21	6,12	6,24	6,65	7,14	8,33	6,19	6,36	6,73	7,11	8,05
Gem.	6,34	6,43	6,68	6,95	8,40	6,22	6,34	6,53	7,08	8,26	6,15	6,27	6,61	7,12	8,33	6,26	6,38	6,65	7,23	8,15
♂ geslachtsrijp ↗																				
1	6,28	6,38	6,41	6,91	8,10	6,24	6,22	6,25	6,72	7,88	6,30	6,23	6,35	6,69	7,85	6,13	6,16	6,24	6,84	7,75
2	6,35	6,31	6,50	6,83	7,83	6,10	6,18	6,21	6,70	7,64	6,19	6,36	6,42	6,92	7,80	6,28	6,33	6,38	6,95	7,94
3	6,27	6,35	6,39	6,74	7,85	6,25	6,30	6,43	6,83	7,72	6,21	6,25	6,30	6,72	7,99	6,20	6,27	6,28	6,81	8,03
Gem.	6,30	6,35	6,43	6,83	7,92	6,19	6,23	6,29	6,75	7,75	6,23	6,28	6,36	6,78	7,88	6,21	6,25	6,30	6,87	7,90
♂ niet geslachtsrijp ↗																				
1	6,12	6,18	6,52	7,15	8,45	-	-	-	-	-	6,17	6,33	6,60	7,25	8,28	6,28	6,33	6,77	7,13	8,28
2	6,09	6,32	6,46	6,92	8,14	6,30	6,35	6,69	6,85	8,55	6,31	6,40	6,72	7,04	8,15	6,15	6,37	6,60	6,88	8,01
3	6,20	6,30	6,66	7,23	8,21	6,22	6,46	6,50	7,12	8,36	6,12	6,31	6,57	7,18	8,49	6,13	6,25	6,63	7,05	8,09
Gem.	6,14	6,26	6,55	7,10	8,27	6,26	6,40	6,59	6,98	8,46	6,20	6,35	6,63	7,16	8,31	6,18	6,31	6,66	7,02	8,12

Tabel A40 - Evolutie van de elektrische weerstand in *S. leanthias* tijdens het bewaren in ijs (in Q-waarden).

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
0 geslachtsrijp +																				
1	84	63	32	30	12	68	56	25	14	10	69	30	21	9	0	-	-	-	-	-
2	75	50	45	37	14	60	43	35	28	8	85	54	37	19	4	67	58	47	34	5
3	55	47	30	17	6	67	35	24	17	1	78	35	32	12	0	58	39	35	13	2
Gem.	<u>71</u>	<u>53</u>	<u>35</u>	<u>28</u>	<u>11</u>	<u>65</u>	<u>45</u>	<u>28</u>	<u>20</u>	<u>6</u>	<u>77</u>	<u>39</u>	<u>30</u>	<u>13</u>	<u>1</u>	<u>62</u>	<u>48</u>	<u>41</u>	<u>24</u>	<u>3</u>
0 niet geslachtsrijp +																				
1	73	46	37	24	15	80	32	18	14	10	65	25	21	8	4	62	26	13	2	4
2	80	54	42	13	8	82	45	33	10	2	79	38	29	11	4	66	42	31	21	13
3	71	31	21	7	0	86	30	20	7	3	60	22	12	0	0	83	31	24	5	3
Gem.	<u>74</u>	<u>43</u>	<u>33</u>	<u>15</u>	<u>8</u>	<u>83</u>	<u>36</u>	<u>24</u>	<u>10</u>	<u>5</u>	<u>68</u>	<u>28</u>	<u>20</u>	<u>6</u>	<u>3</u>	<u>70</u>	<u>33</u>	<u>22</u>	<u>12</u>	<u>7</u>
0 geslachtsrijp ↗																				
1	76	58	51	17	4	81	45	40	25	1	74	47	46	37	16	85	46	40	20	7
2	58	41	38	14	2	79	31	20	12	4	58	40	34	18	15	70	51	38	30	11
3	63	39	30	25	10	61	34	32	10	0	77	62	54	24	10	73	34	31	16	4
Gem.	<u>66</u>	<u>46</u>	<u>40</u>	<u>19</u>	<u>5</u>	<u>73</u>	<u>37</u>	<u>31</u>	<u>15</u>	<u>2</u>	<u>70</u>	<u>50</u>	<u>45</u>	<u>26</u>	<u>14</u>	<u>76</u>	<u>43</u>	<u>36</u>	<u>22</u>	<u>7</u>
0 niet geslachtsrijp ↗																				
1	84	31	15	8	5	-	-	-	-	-	70	49	42	14	12	76	46	30	13	3
2	87	28	24	10	8	78	38	12	7	0	74	38	35	26	18	80	30	10	6	1
3	71	42	36	20	13	67	21	19	16	8	58	33	24	8	8	59	34	16	4	0
Gem.	<u>80</u>	<u>34</u>	<u>25</u>	<u>13</u>	<u>9</u>	<u>72</u>	<u>29</u>	<u>16</u>	<u>11</u>	<u>4</u>	<u>67</u>	<u>40</u>	<u>34</u>	<u>16</u>	<u>13</u>	<u>71</u>	<u>37</u>	<u>19</u>	<u>7</u>	<u>1</u>

Tabel A41 - Kwoteringen van de organoleptische keuring van *S. acanthias* tijdens het bewaren in ijs (op 30 p.).

Proef	Lente					Zomer					Herfst					Winter				
	2d	5d	7d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
♀ geslachtsrijp																				
1	30	28	17	11	4	28	23	20	16	5	30	25	16	10	5	-	-	-	-	-
2	29	23	20	15	0	30	27	16	15	3	30	29	22	8	1	30	28	19	15	4
3	30	25	16	10	5	29	23	15	12	6	28	26	18	11	1	28	27	17	12	3
Gem.	<u>30</u>	<u>25</u>	<u>18</u>	<u>12</u>	<u>3</u>	<u>29</u>	<u>24</u>	<u>17</u>	<u>14</u>	<u>5</u>	<u>29</u>	<u>27</u>	<u>19</u>	<u>10</u>	<u>2</u>	<u>29</u>	<u>27</u>	<u>18</u>	<u>13</u>	<u>3</u>
♀ niet geslachtsrijp																				
1	30	24	10	9	0	28	27	15	10	1	29	27	15	10	3	30	28	13	7	0
2	30	21	13	6	0	30	28	15	4	3	29	25	16	8	3	29	25	15	9	1
3	29	25	12	5	2	28	24	12	5	1	28	24	13	5	0	29	27	12	5	1
Gem.	<u>30</u>	<u>23</u>	<u>12</u>	<u>7</u>	<u>1</u>	<u>29</u>	<u>26</u>	<u>14</u>	<u>6</u>	<u>2</u>	<u>29</u>	<u>25</u>	<u>15</u>	<u>8</u>	<u>2</u>	<u>29</u>	<u>27</u>	<u>13</u>	<u>7</u>	<u>1</u>
♂ geslachtsrijp																				
1	28	22	19	11	2	29	21	17	11	3	29	25	16	10	4	28	23	17	10	3
2	30	26	16	15	4	28	24	20	13	6	30	27	20	15	5	30	27	21	11	0
3	28	23	15	14	4	29	23	18	10	2	30	26	15	10	3	28	27	18	14	2
Gem.	<u>29</u>	<u>24</u>	<u>17</u>	<u>13</u>	<u>3</u>	<u>29</u>	<u>23</u>	<u>18</u>	<u>11</u>	<u>4</u>	<u>30</u>	<u>26</u>	<u>17</u>	<u>12</u>	<u>4</u>	<u>29</u>	<u>26</u>	<u>19</u>	<u>12</u>	<u>2</u>
♂ niet geslachtsrijp																				
1	30	27	13	6	0	-	-	-	-	-	28	21	14	6	4	30	25	13	8	1
2	30	22	14	10	0	29	26	17	6	0	28	22	13	6	2	30	26	15	4	2
3	30	26	11	9	1	28	26	14	9	3	30	25	10	7	3	29	23	14	5	0
Gem.	<u>30</u>	<u>25</u>	<u>13</u>	<u>8</u>	<u>0</u>	<u>29</u>	<u>26</u>	<u>15</u>	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>29</u>	<u>23</u>	<u>12</u>	<u>6</u>	<u>3</u>	<u>30</u>	<u>25</u>	<u>14</u>	<u>6</u>	<u>1</u>

Tabel A42 - Invloed van geslachtsrijpheid, metamerie en laagdikte op pH, VRS, TMA, α -amino-N, peptiden en ammoniak.

pH										
Geslachtsrijp ; kleine metamerie (G1)						Geslachtsrijp ; grote metamerie (G2)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	6,35	6,33	6,32	6,46	7,56	6,29	6,35	6,28	6,71	7,71
2	6,28	6,35	6,38	6,66	7,79	6,40	6,27	6,30	6,74	7,80
3	6,23	6,26	6,37	6,52	7,57	6,27	6,28	6,41	6,92	7,52
Gem.	<u>6,29</u>	<u>6,31</u>	<u>6,36</u>	<u>6,55</u>	<u>7,64</u>	<u>6,32</u>	<u>6,30</u>	<u>6,33</u>	<u>6,79</u>	<u>7,68</u>
Geslachtsrijp ; dubbele dikte (G3)						Niet geslachtsrijp (N.G.)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	6,39	6,30	6,35	6,52	7,35	6,25	6,34	6,54	7,30	8,53
2	6,36	6,40	6,27	6,44	7,38	6,33	6,38	6,45	7,09	8,26
3	6,32	6,27	6,28	6,44	7,20	6,27	6,40	6,49	7,24	8,36
Gem.	<u>6,36</u>	<u>6,32</u>	<u>6,30</u>	<u>6,47</u>	<u>7,31</u>	<u>6,31</u>	<u>6,37</u>	<u>6,49</u>	<u>7,21</u>	<u>8,38</u>
VRS (μ eq/5 ml)										
Geslachtsrijp ; kleine metamerie (G1)						Geslachtsrijp ; grote metamerie (G2)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	3,4	3,6	8,9	14,7	36,2	6,5	11,9	11,5	15,3	48,0
2	1,2	4,7	5,9	23,5	45,1	3,4	8,5	10,8	17,4	40,4
3	7,8	10,2	10,7	21,1	41,8	8,0	9,9	6,9	13,0	49,8
Gem.	<u>4,1</u>	<u>6,2</u>	<u>8,5</u>	<u>19,8</u>	<u>41,0</u>	<u>6,0</u>	<u>10,1</u>	<u>9,7</u>	<u>15,2</u>	<u>46,1</u>
Geslachtsrijp ; dubbele dikte (G3)						Niet geslachtsrijp (N.G.)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	8,0	5,4	14,9	13,3	34,8	9,1	9,5	20,9	25,3	58,2
2	1,3	7,1	11,2	20,0	25,4	4,0	9,9	19,6	28,4	66,2
3	2,8	2,9	8,2	15,2	30,2	7,6	14,6	10,6	21,7	66,5
Gem.	<u>4,0</u>	<u>5,1</u>	<u>11,4</u>	<u>16,2</u>	<u>30,1</u>	<u>6,9</u>	<u>11,3</u>	<u>17,0</u>	<u>25,1</u>	<u>63,6</u>

Tabel A42 - (vervolg).

TMA (mg N %)										
Geslachtsrijp ; kleine metamerie (G1)						Geslachtsrijp ; grote metamerie (G2)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	0,5	0,3	2,4	3,7	12,2	0	0,3	2,0	6,4	18,1
2	0	0,7	1,0	4,6	16,3	0,2	0,1	0,8	4,2	11,9
3	0	0,2	1,6	5,1	12,4	0	0,1	0,6	5,8	12,1
Gem.	<u>0,2</u>	<u>0,4</u>	<u>1,7</u>	<u>4,4</u>	<u>13,6</u>	<u>0,1</u>	<u>0,2</u>	<u>1,1</u>	<u>5,5</u>	<u>14,0</u>
Geslachtsrijp ; dubbele dikte (G3)						Niet geslachtsrijp (N.G.)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	0	0,1	1,6	3,5	9,3	0	2,1	5,1	6,9	12,0
2	0	0,4	2,2	4,4	12,4	0,1	0,6	0,9	6,6	16,1
3	0	0,2	0,7	2,1	7,3	0,1	1,6	4,9	4,5	8,3
Gem.	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<u>1,5</u>	<u>3,3</u>	<u>9,7</u>	<u>0,1</u>	<u>1,4</u>	<u>3,6</u>	<u>6,0</u>	<u>12,1</u>
α - amino-N (mg N %)										
Geslachtsrijp ; kleine metamerie (G1)						Geslachtsrijp ; grote metamerie (G2)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	55	57	44	52	50	63	55	43	78	45
2	60	38	28	64	41	70	42	50	61	27
3	46	48	39	78	30	45	46	35	69	36
Gem.	<u>54</u>	<u>47</u>	<u>37</u>	<u>65</u>	<u>40</u>	<u>59</u>	<u>48</u>	<u>43</u>	<u>69</u>	<u>36</u>
Geslachtsrijp ; dubbele dikte (G3)						Niet geslachtsrijp (N.G.)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	71	58	41	59	56	60	52	27	85	80
2	54	59	60	66	52	80	61	44	102	84
3	57	41	39	51	41	73	54	25	88	69
Gem.	<u>61</u>	<u>52</u>	<u>47</u>	<u>58</u>	<u>50</u>	<u>71</u>	<u>56</u>	<u>32</u>	<u>91</u>	<u>77</u>

Tabel A42 - (Vervolg).

peptiden (mg N %)										
Geslachtsrijp ; kleine metamerie (G1)						Geslachtsrijp ; grote metamerie (G2)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	61	57	52	40	33	59	47	39	40	30
2	41	40	36	-	20	70	38	50	25	15
3	59	46	45	54	31	55	42	37	38	17
Gem.	<u>54</u>	<u>48</u>	<u>44</u>	<u>31</u>	<u>28</u>	<u>61</u>	<u>42</u>	<u>42</u>	<u>34</u>	<u>21</u>
Geslachtsrijp ; dubbele dikte (G3)						Niet geslachtsrijp (N.G.)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	65	61	50	44	40	56	45	40	29	29
2	53	46	57	31	25	44	50	46	30	18
3	57	45	42	41	31	46	39	31	21	24
Gem.	<u>58</u>	<u>50</u>	<u>49</u>	<u>38</u>	<u>32</u>	<u>49</u>	<u>44</u>	<u>39</u>	<u>26</u>	<u>23</u>
ammoniak (mg N %)										
Geslachtsrijp ; kleine metamerie (G1)						Geslachtsrijp ; grote metamerie (G2)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	25	23	26	50	105	19	20	18	51	91
2	15	16	22	37	87	26	15	28	39	80
3	18	16	25	38	89	21	14	19	44	83
Gem.	<u>19</u>	<u>18</u>	<u>24</u>	<u>42</u>	<u>93</u>	<u>22</u>	<u>16</u>	<u>22</u>	<u>45</u>	<u>84</u>
Geslachtsrijp ; dubbele dikte (G3)						Niet geslachtsrijp (N.G.)				
Proef	2d	5d	9d	12d	19d	2d	5d	9d	12d	19d
1	27	18	35	42	81	22	35	44	70	119
2	15	20	22	31	66	28	24	32	58	134
3	18	24	25	34	69	21	23	34	56	114
Gem.	<u>20</u>	<u>21</u>	<u>27</u>	<u>36</u>	<u>72</u>	<u>24</u>	<u>27</u>	<u>37</u>	<u>61</u>	<u>122</u>